

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA**

**Escola Superior Agrária de Beja**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

**Avaliação do desempenho de duas membranas de  
ultrafiltração para a separação da fração proteica de sorelho  
de ovelha**

**Processos de ultrafiltração/diafiltração**

**Nádia Patrícia de Oliveira Morais**

**Beja**

**2017**



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BEJA**

**Escola Superior Agrária**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

**Avaliação do desempenho de duas membranas de  
ultrafiltração para a separação da fração proteica de soro de  
de ovelha**

**Processos de ultrafiltração/diafiltração**

**Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar, realizado na Escola Superior  
Agrária do Instituto Politécnico de Beja**

**Nádia Patrícia de Oliveira Morais**

**Orientador:**

**Doutora Antónia Macedo**

**Beja**

**2017**

## **Agradecimentos**

Quero agradecer ao meu amado pai Anacleto Morais, que incansavelmente me apoiou na concretização dos meus planos, à minha tia Lucy que sempre esteve presente, e aos meus irmãos.

Ao meu querido namorado Carlos, quero agradecer o amor e a alegria contagiante, carinho a amizade, é uma bênção.

À professora Doutora Antónia Teresa Zorro Nobre Macedo gostaria de agradecer na qualidade de orientadora, pela oportunidade além de trabalharmos juntas de conhecer essa maravilhosa pessoa que é, pela dedicação, compreensão, amizade e disponibilidade.

À Maria Amaro que nestes últimos meses tem sido uma bênção na minha vida, um cuidado e um carinho, obrigada, de coração!

À Célia Lampreia, Joana Monteiro, agradeço pela amizade, carinho, e apoio ao longo do trabalho experimental.

À Maria Diogo, Fernanda Matias, Margarida Matias e à Libânia Grilo pelo carinho com que me receberam, e por fazerem com que me sentisse em casa.

À D. Ângela da queijaria Alvito, por ter fornecido o sorelho de ovelha usado nesta dissertação, e por se ter disponibilizado a entrega-lo diretamente, agradeço.

Aos meus amigos, em especial à Inês Rosa e à Rosaline Lopes por estarem do meu lado, por serem pessoas especiais e me fazerem sentir que mesmo estando longe estariam presentes para me ouvir, por serem verdadeiros amigos e terem sempre uma palavra a dizer, tornando-se sempre presentes nesta fase da minha vida.

Aos meus familiares, namorado e amigos compartilho convosco a alegria desta realização

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação, os meus sinceros agradecimentos.

## Resumo

Este trabalho teve como objetivos comparar o desempenho de duas membranas de ultrafiltração para a recuperação da fração proteica de soro de ovelha e avaliar métodos de dia/ultrafiltração para a sua purificação.

O trabalho experimental envolveu a realização de ensaios de ultrafiltração e dia-ultrafiltração até um fator de concentração volúmico (FCV) de 2,0, com membranas RC70PP e ETNA 01 PP, de pesos moleculares de corte de 10 e 1 kDa, respetivamente. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições de pressão, caudal de circulação e temperatura, respetivamente 2,0 bar, 10 Lmin<sup>-1</sup> e 25°C. Os ensaios de dia-ultrafiltração foram realizados em modo descontínuo, com diferentes metodologias: só com adição de água (simples) e com adição intercalada de diafiltrado (mista). O desempenho das membranas foi determinado em termos de fluxos de permeado e coeficientes de rejeição aparente aos sólidos totais, sais, proteína e lactose.

As membranas ETNA 01 PP apresentaram menores fluxos de permeado (produtividade inferior), mas melhor seletividade para separar a fração proteica e a lactose, porque os coeficientes de rejeição aparente à proteína foram superiores (95,0%) e os da lactose inferiores (2,7%).

A diafiltração simples foi mais eficiente porque permitiu maiores remoções de lactose e sais, respetivamente 30% e 20%.

Futuramente a ultrafiltração de soro será realizada até maiores fatores de concentração e o processo de diafiltração será estudado mais detalhadamente.

**Palavras-chave:** Soro de ovelha, ultrafiltração, dia-ultrafiltração, concentrados proteicos

## **Abstract**

The goal of this work was to compare the performance of two ultrafiltration membranes for the recovery of protein fraction of second cheese whey from sheep as well as the evaluation of methods of dia-ultrafiltration for its purification.

The experimental work involved ultrafiltration and diafiltration tests up to a volumetric concentration factor (VCF) of 2,0, with RC70PP and ETNA01PP membranes, with molecular weight cut-offs of 10 kDa and 1 kDa, respectively. The assays were performed under the same conditions of pressure, flow rate and temperature, respectively, 2.0 bar, 10 Lmin<sup>-1</sup> and 25 ° C. Diafiltration assays were performed in discontinuous in two different ways: with only addition of water (single) and alternate with diafiltrate (mixed). The performance of the membranes was determined in terms of permeation fluxes and of apparent rejection coefficients to total solids, salts, total protein and lactose.

ETNA 01 PP membranes showed lower permeate fluxes (smaller productivity) but proved to be the most effective for the separation of the protein fraction and the lactose rich fraction, because the apparent rejection coefficients of protein were higher (95,0%) and those from lactose lower (2,7%).

The single dia-ultrafiltration process was better because it led to a higher removal of lactose and salts, respectively 30% and 20%.

In a future work, the ultrafiltration of second cheese whey will be carried out to higher volume concentration factors and dia-ultrafiltration process will be studied in more detail.

**Keywords:** Ovine second cheese whey, ultrafiltration, diafiltration, protein concentrates.

# Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice.....	iv
Índice de tabelas.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Lista de Abreviaturas e siglas.....	ix
Introdução.....	1
Capítulo 1- Revisão Bibliográfica.....	4
1.1 Leite de Ovelha.....	4
1.2 Soro de leite de ovelha.....	5
1.3 Sorelho.....	7
1.4 Processos de separação por membranas.....	9
1.5 Processos de separação por membranas controlados pela pressão.....	10
1.6 Ultrafiltração: fundamentos.....	12
1.6.1 Diafiltração.....	16
1.6.2 Aplicações da ultrafiltração em laticínios.....	17
Capítulo 2 - Parte experimental.....	18
2.1 Introdução.....	18
2.2 Membranas.....	19
2.3 Material.....	21
2.3.1 Sorelho.....	21
2.3.2 Amostragem e armazenamento das amostras.....	21
2.3.3 Pré-tratamento das amostras.....	22
2.3.4 Métodos analíticos utilizados na caracterização físico-química das amostras ...	22
2.4 Equipamento.....	23
2.4.1 Procedimento e condições operatórias.....	24
2.4.2 Lavagem e desinfecção das membranas.....	26
2.5 Ensaio de permeação.....	27
2.5.1 Determinação da permeabilidade hidráulica das membranas.....	27
2.5.2 Ensaio de ultrafiltração.....	28
2.5.3 Ensaio de diafiltração em modo de ultrafiltração (dia-ultrafiltração).....	29
Capítulo 3- Resultados e discussão.....	32
3.1 Permeabilidade hidráulica das membranas.....	32

<b>3.2 Ensaio de ultrafiltração em modo de concentração.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1 Avaliação da produtividade das membranas em estudo .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2 Caracterização físico-química média dos concentrados e permeados obtidos e avaliação da seletividade.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Ensaio de diafiltração com água desionizada em modo de ultrafiltração .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1 Variação dos fluxos de permeado com o tempo ao longo da diafiltração simples .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.2 Avaliação das eficiências de remoção durante a diafiltração.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 Ensaio de diafiltração mistos em modo de ultrafiltração.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.1 Variação dos fluxos de permeado com o tempo ao longo das etapas de diafiltração mista.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.2 Avaliação das eficiências de remoção durante os ensaios de dia-ultrafiltração mistos.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4.3 Comparação entre as composições dos concentrados finais.....</b>	<b>46</b>
<b>Capítulo 4 - Conclusão e perspectivas futuras .....</b>	<b>48</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>49</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>54</b>



## Índice de tabelas

Tabela 1- Composição do leite bovino e do leite ovino.....	4
Tabela 2- Composição média do soro de leite bovino e do soro de leite ovino.....	5
Tabela 3- Composição média do soro de leite, soro de leite ovino e bovino.....	8
Tabela 4- Algumas características dos processos de separação com membranas controlados pela pressão.....	11
Tabela 5- Algumas características das membranas fornecidas pelo fabricante.....	20
Tabela 6- Permeabilidade hidráulica e permeabilidade intrínseca das membranas RC70PP e ETNA01PP .....	33
Tabela 7 - Caracterização físico-química média do soro de leite com indicação do desvio padrão (n=8) .....	36
Tabela 8- Caracterização físico-química média dos concentrados e permeados com apresentação dos desvios padrão (n=6) e respectivos coeficientes de rejeição aparente (R) .....	37

## Índice de figuras

Figura 1 - Representação esquemática de um processo de separação com membrana .....	10
Figura 2- Variação do fluxo de permeado com a pressão transmembranar aplicada (adaptado de Cheryan, 1998). .....	13
Figura 3 - Polarização de concentração (adaptado de Mulder,1998). .....	14
Figura 4- Diagrama do processo UF/DF simples.....	19
Figura 5- Diagrama do processo UF/DF misto .....	19
Figura 6- Fluxograma do processo de fabrico artesanal de requeijão e produção de sorelho .....	21
Figura 7- Representação esquemática da instalação Lab-unit M20, adaptado (Macedo, 2010) .....	23
Figura 8- Unidade básica da célula de permeação da instalação Lab-unit M20 (Macedo, 2010) .....	24
Figura 9- Variação dos fluxos de permeado à água desionizada com pressão transmembranar aplicada .....	32
Figura 10 - Variação dos fluxos médios de permeado com o tempo nos ensaios controlo realizados com ambas as membranas, obtidos até um FCV= 2,0 .....	35
Figura 11- Variação dos fluxos de permeado ao longo do processo de diafiltração simples obtida com as membranas ETNA01PP .....	39
Figura 12- Variação dos fluxos de permeado ao longo do processo de diafiltração simples obtida com as membranas RC70PP .....	40
Figura 13- Variação da eficiência de remoção de alguns componentes ao longo do processo de dia-ultrafiltração simples com as membranas RC70PP .....	42
Figura 14 - Variação da eficiência de remoção de alguns componentes ao longo do processo de dia-ultrafiltração simples com as membranas ETNA01PP .....	42
Figura 15- Variação dos fluxos de permeado ao longo do processo de diafiltração mista obtida com as membranas RC70PP .....	43
Figura 16- Variação dos fluxos de permeado ao longo do processo de diafiltração mista obtida com as membranas ETNA01PP .....	44
Figura 17 - Variação da eficiência de remoção de alguns componentes ao longo do processo de dia-ultrafiltração misto com as membranas RC70PP .....	45
Figura 18 - Variação da eficiência de remoção de alguns componentes ao longo do processo de dia-ultrafiltração misto com membranas ETNA01PP .....	46
Figura 19 - Composição média do sorelho pré-tratado e dos concentrados obtidos a partir da sua ultrafiltração com membranas RC70PP .....	47

<b>Figura 20 - Composição média do soro pré-tratado e dos concentrados obtidos a partir da sua ultrafiltração com membranas ETNA01PP.....</b>	<b>47</b>
---	-----------

## **Lista de Abreviaturas e siglas**

$J_w$	Fluxo volumétrico
$L_p/\mu$	Permeabilidade hidráulica da membrana
$L_p$	Permeabilidade hidráulica intrínseca da membrana
$\Delta P$	Pressão transmembranar aplicada
$\mu$	Viscosidade do permeado
MF	Microfiltração
UF	Ultrafiltração
NF	Nanofiltração
OI	Osmose Inversa
CPS	Concentrados proteicos de soro
IPS	Isolados de proteína de soro
FCV	Fator de concentração volumétrica



## Introdução

O soro lácteo é o líquido que permanece em solução após a precipitação da matéria gorda e das caseínas do leite durante a produção de queijo. Este subproduto da indústria de produção de queijo contém ainda quantidades consideráveis de proteínas, lactose e minerais, os quais representam metade dos constituintes do leite e cerca de 90% do seu volume. Os componentes principais do seu extrato seco (cerca de 65 g L<sup>-1</sup>) são a lactose (70-80%), proteínas solúveis (9%, que corresponde a 20% das proteínas do leite) e minerais (8-20%) (Dauvin *et al.*, 1998) podendo ainda existir, em proporções menores outros componentes, tais como, péptidos hidrolisados da caseína *K*, resultante do fabrico do queijo, lípidos, bactérias (Walstra and Noomen, 2001)

É considerado o subproduto mais importante da indústria de lacticínios, não apenas pelo elevado volume gerado, como também por possuir elevada carga orgânica (Leidens, 2013). A produção mundial do soro lácteo está estimada em 160 milhões de toneladas por ano, sendo a maior parte dele soro bovino. No entanto, grande parte deste soro não tem aproveitamento, sendo considerado ainda um resíduo e, portanto, é descarregado juntamente com os esgotos domésticos, nas estações de tratamento de águas residuais ou então aproveitado para alimentação animal (Leidens, 2013).

Em Portugal, a produção de leite de ovelha representa cerca de 3,5% da produção total de leite, sendo quase totalmente utilizada na produção de queijo. Esta percentagem é elevada comparativamente com os valores mundiais da produção de leite de ovelha (1%) (Skoet, *et al.*, 2012), o que evidencia a sua importância a nível nacional. De acordo com as estatísticas mais recentes (INE, 2015), a produção de queijos de ovelha atingiu em 2014 cerca de 10.000 ton, o que corresponde a cerca de 55000 ton de soro de queijo, atendendo aos rendimentos usuais de fabrico. Como a concentração das proteínas do soro de ovelha é superior (aproximadamente o dobro) à existente no leite de vaca, parte deste soro produzido é posteriormente processado para obter queijos de soro, os quais são designados por Ricotta, Requesón e Requeijão, em Itália, Espanha e Portugal, respetivamente (Macedo *et al.*, 2011). Contudo, nem todo o soro é utilizado no fabrico de requeijão e, além disso, o processo de produção deste liberta ainda um segundo soro, designado por sorelho, que contém ainda cerca de 50% do extrato seco do soro inicial, pelo que também possui uma elevada carga orgânica. Em casos pontuais, o sorelho é usado para alimentação animal. Desta forma, os elevados volumes de soro e sorelho

produzidos (cerca de 18 L de soro são libertados por kg de requeijão) continuam ainda a ser um problema para os produtores de queijo, os quais se defrontam constantemente com a valorização/impacto ambiental do seu maior subproduto (Macedo *et al.*, 2011). A carga orgânica do soro é ainda bastante elevada, com valores de carência bioquímica e química de oxigénio de cerca de 10000 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> e 70000 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, respetivamente (Macedo *et al.*, 2005).

Atualmente é reconhecido o valor nutricional do soro lácteo, principalmente devido às excelentes propriedades nutricionais, biológicas e funcionais das suas proteínas (Macedo A. T., 2010). Na recuperação das proteínas do soro, os processos de separação por membranas, nomeadamente a ultrafiltração, têm ocupado um lugar de destaque desde os anos sessenta, com o desenvolvimento de membranas assimétricas com uma fina camada ativa (Daufin *et al.*, 1998). De facto a partir desta altura, surgiu uma grande variedade de novos produtos, extensivamente usados por várias indústrias, nomeadamente a indústria alimentar (Daufin *et al.*, 1998); (Horton, 1995); (Zydney, 1998) (Cheryan, 1998).

A ultrafiltração (UF) tem sido o processo mais utilizado para separar a fração proteica da fração rica em lactose, sendo a primeira retida pelas membranas de ultrafiltração, enquanto a lactose, minerais e outros componentes de menor massa molar permeiam através das membranas, constituindo a corrente de permeado (Kevin *et al.*, 2007). Em relação a outros processos de concentração, como por exemplo a evaporação, a ultrafiltração apresenta diversas vantagens, tais como, menores consumos energéticos, dado que o processo ocorre a temperaturas mais baixas, o que é também uma vantagem quando se trabalha com fluidos alimentares pois evita a perda de aromas. Além disso, outras vantagens dos processos de separação com membranas são: as propriedades das membranas são variáveis, podendo ser bastante seletivas para dados componentes; não são adicionados aditivos; os módulos são compactos, o que significa menores custos de capital e vários materiais, quer de natureza orgânica ou inorgânica podem ser usados no fabrico de membranas (Macedo, 2013).

No entanto, a ultrafiltração do soro, mesmo em condições de operação otimizadas produz em geral concentrados de proteína com teores entre 8-10% (Kevin *et al.*, 2007). A fim de aumentar a concentração de proteína nos retentados obtidos é utilizada a dia-ultrafiltração. Este processo aumenta a permeação de espécies não proteicas através da

membrana, podendo obter-se concentrados proteicos mais puros e com teores de proteína superiores a 40% (em base seca) (Kevin *et al.*, 2007).

Face ao anteriormente exposto, o objetivo geral deste trabalho é recuperar a fração proteica do soro de ovelha por ultrafiltração/diafiltração, tendo em vista a valorização deste subproduto, contribuindo simultaneamente para a minimização do seu impacto ambiental, através da redução da sua carga orgânica. Os objetivos específicos a atingir são os seguintes:

- (i) Comparar o desempenho de duas membranas diferentes de ultrafiltração para o fracionamento de soro de ovelha (fração proteica e fração rica em lactose).
- (ii) Avaliar a eficiência de diferentes métodos de dia-ultrafiltração na purificação de concentrados proteicos da ultrafiltração.



# Capítulo 1- Revisão Bibliográfica

## 1.1 Leite de Ovelha

A criação de pequenos ruminantes (ovelha e cabra) e a produção de leite é uma parte importante da economia de muitos países, destacando-se com maiores volumes de produção de leite de ovelha, os países mediterrânicos, do médio oriente e do norte de África (Berger *et al.*, 2004), (Park *et al.*, 2007), (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization) de 2010, a produção de leite de ovinos corresponde a 1.4% da produção mundial de leite, com pouco mais de 10 milhões de toneladas. O leite de ovino situa-se em quarto lugar, depois do leite bovino (82,9%), bubalino (13%) e caprino (2,3%) (Leidens, 2013).

A composição química do leite pode variar significativamente de acordo com a época do ano, raça, estágio de lactação, variações durante a ordenha, condições climáticas, idade, saúde e alimentação do animal (Park *et al.*, 2007). Em comparação com o leite de vaca, o leite de ovelha é mais rico em proteínas e gordura, conforme mostra a Tabela 1.

**Tabela 1- Composição do leite bovino e do leite ovino**

Componente	Leite bovino	Leite ovino
Sólidos totais (%)	12,0-12,7	17,7-19,3
Gordura (%)	3,4-3,7	7,0-7,9
Caseína (%)	2,6-2,7	3,7-3,9
Proteínas do soro (%)	0,6-0,7	0,8-1,1
Lactose (%)	4,6-4,8	4,5-5,3
Minerais (%)	0,7-0,8	0,8-1,0

Fonte: (Bylund, 1995); (Fox and McSweeney, 1998); (Miller *et al.*, 2000) referenciado em (Leidens, 2013).

As proteínas presentes estão divididas em duas frações principais: as caseínas (80% das proteínas totais do leite de vaca e 82% das proteínas totais do leite de ovelha) e as proteínas do soro. As proteínas do soro são distintas das caseínas por serem menores, globulares, compactas, solúveis numa ampla faixa de pH, termolábeis e não coaguláveis pela renina (Bylund, 1995); (Berger *et al.*, 2004).

Segundo alguns autores (Brito *et al.*, 2006), (Park *et al.*, 2007) e (Rohenkohl *et al.*, 2011), a maior parte do leite de ovino obtido é transformado em queijo. Devido ao seu teor proteico e gordura é indicado para o fabrico de queijos com aromas e sabores especiais, de elevado valor comercial, sendo o Roquefort, o Manchego, o Pecorino e o Feta os mais consumidos.

## **1.2 Soro de leite de ovelha**

O soro é o principal subproduto da indústria de laticínios, proveniente do fabrico de queijo e contém cerca de 50% dos nutrientes do leite (Bylund, 1995).

Durante a produção do queijo há uma separação dos nutrientes do leite entre o coalho e o soro. Os componentes insolúveis em água (caseína e gordura) permanecem no coalho, enquanto os constituintes solúveis em água (lactose, sais e proteínas do soro) são retidos no soro. A distribuição dos componentes do leite depende do tipo de queijo que se está a produzir, da qualidade da matéria-prima e das formas de coagulação da caseína. Os microrganismos e as enzimas que ajudam no processo de maturação também podem alterar a repartição dos nutrientes (Miller *et al.*, 2000).

O soro possui na sua constituição água, lactose, proteínas, sais minerais, gordura e vitaminas mas, no entanto, sabe-se que o teor destes componentes varia de acordo com a variedade de queijo produzido, bem como com o tipo de leite e o processamento ao qual é submetido (Bylund, 1995); (Berger *et al.*, 2004). A Tabela 2 apresenta a composição média do soro de leite de vaca e do soro de leite de ovelha.

**Tabela 2- Composição média do soro de leite bovino e do soro de leite ovino**

<b>Componente</b>	<b>Soro de leite bovino</b>	<b>Soro de leite ovino</b>
Sólidos totais (%)	5,8-6,5	6,7-7,6
Gordura (%)	0,2-0,25	0,35-0,4
Proteínas do soro(%)	0,6-0,8	0,8-1,3
Lactose(%)	4,4-4,5	4,2-5,0
Minerais(%)	0,5-0,8	0,6-0,9

Fonte: adaptado de (Bylund, 1995); (Fox and McSweeney, 1998); (Miller *et al.*, 2000).

Conforme se pode observar na Tabela 2, o soro de leite de ovino é mais rico em proteína e gordura. As principais proteínas do soro são a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactalbumina e, em menores quantidades, a albumina do soro, as imunoglobulinas e a lactoferrina (Leidens, 2013).

Os principais tipos de soro de leite são o doce e o ácido. Obtém-se o soro doce quando a coagulação da caseína é enzimática e o seu pH é maior ou igual a 5,6 (Morr, 1989), (Daufin *et al.*, 1998) sendo proveniente do fabrico dos queijos duros. O soro ácido apresenta um pH menor ou igual a 5, uma vez que a coagulação da caseína é ácida, sendo originado em geral no fabrico de queijos do tipo Cottage. A composição proteica dos dois soros é semelhante sendo, no entanto, o soro doce mais rico em lactose, enquanto o soro ácido exibe uma maior concentração em sais minerais (Leidens, 2013).

A composição do soro pode variar em função da composição do leite, do tipo de tratamento a que este é sujeito durante o processo de fabrico do queijo (homogeneização, aquecimento, adição de cloreto de sódio, etc.) ou da produção de caseínas e também com o processo a que ele é sujeito após ser separado do coalho, como por exemplo pasteurização, filtração para remoção de flocos de caseína (Macedo, 2010).

O soro de leite tem sido visto como um resíduo da indústria dos lacticínios com pouco valor perante o consumidor, mas atualmente aumentou o interesse pelas

propriedades nutricionais e funcionais das proteínas do soro, bem como pelos produtos derivados e as suas funções na saúde humana (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

### **1.3 Sorelho**

O sorelho é um subproduto do soro, resultante da produção de requeijão por coagulação térmica das proteínas do soro. Ele contém cerca de metade do extrato seco do soro inicial (Macedo *et al.*, 2005) (Pereira, 2002). A sua composição, assim como os volumes elevados produzidos, suscitam o interesse pela sua valorização, de forma a maximizar o binómio valor/impacto ambiental. Na Tabela 3 apresentam-se composições médias de sorelho e soros doces de ovelha e de bovino. Como se pode observar nesta tabela a composição do sorelho salienta a importância da sua recuperação devido à sua composição nutricional (proteínas, lactose, minerais), sendo o seu conteúdo proteico e mineral superior ao apresentado pelo soro bovino. Desta forma, é de esperar que vários aproveitamentos do sorelho de ovelha possam ser realizados, à semelhança do que acontece com o soro bovino. O teor mineral é bastante superior no sorelho e no soro de ovelha, devido à adição de sal que ocorre no fabrico de queijo e requeijão.

**Tabela 3- Composição média do soro de leite ovino e bovino**

<b>Componente</b>	<b>Soro de leite ovino</b>	<b>Soro de leite bovino</b>
pH	5,5 – 6,3	5,3-5,9
Sólidos totais (%)	7,1 – 8,3	9,5 – 10,5
Minerais (%)	1,7 – 1,9	1,2-1,8
Lactose(%)	4,5 – 5,7	4,3-6,1
Proteínas do soro (%)	0,8 – 1,2	1,6 – 1,8
Gordura (%)	0,2 – 0,4	1,7 – 2,5

Fonte: Adaptado de (Macedo *et al.*, 2015); (Marshall and Daufin, 1995)

Para além dos componentes maioritários que constam na tabela, tem surgido recentemente um grande interesse por todos os produtos derivados do soro devido à presença de componentes minoritários com funções importantes na saúde humana, tais como péptidos bioativos com propriedades anti-hipertensivas, antioxidantes e antimicrobianas, assim como oligossacáridos, aos quais se atribuem propriedades de fibras dietéticas e prebióticos (Hernández-Ledesma *et al.*, 2008), (Schaafsma, 2008), (Shahidi, 2008). Desta forma, a valorização deste subproduto através da separação destes compostos bioativos para possíveis aplicações futuras tem grande interesse.

## 1.4 Processos de separação por membranas

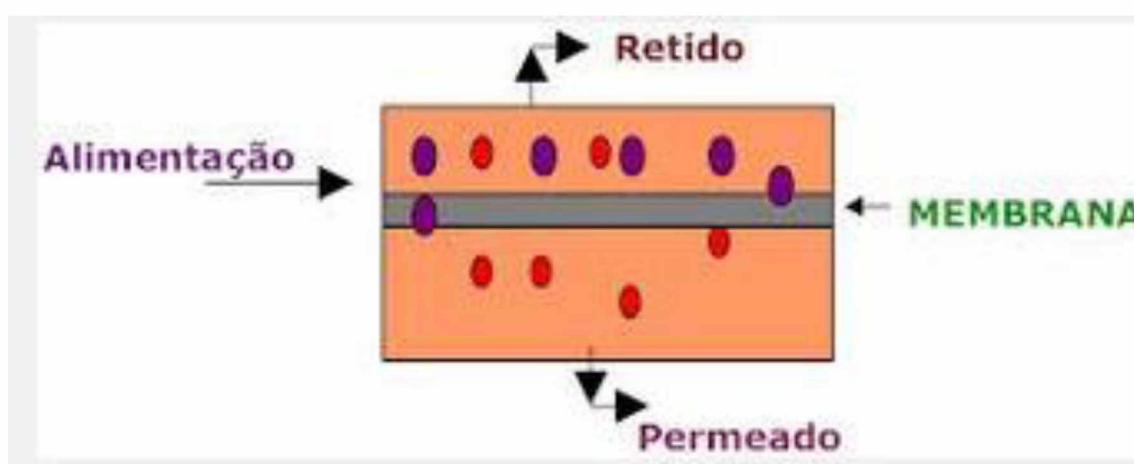
Os processos de separação com membranas são usados desde o início do século XX, tendo sido Zsigmondy, na Alemanha, que introduziu as primeiras membranas. No entanto, o grande incremento na aplicação industrial destas tecnologias só ocorreu a partir do final dos anos 60, com o desenvolvimento de membranas assimétricas (Muller, 1996). Este tipo de membranas permitiu resolver alguns problemas que impediam a expansão destes processos à escala industrial, nomeadamente os baixos fluxos de permeação que caracterizavam as primeiras membranas poliméricas construídas e também a sua pequena seletividade (Loeb and Sourirajan, 1962). Outro fator que contribuiu também para a implementação industrial destas tecnologias foi o arranjo das membranas em configurações caracterizadas por uma grande área superficial por unidade de volume, designados por módulos. Surgiram assim vários tipos de módulos: planos, tubulares, enrolados em espiral e de fibras ocas (Pinho and Rosa, 1994).

Na indústria alimentar, estas tecnologias foram inicialmente utilizadas para concentrar o leite para o fabrico de queijo, por um grupo de investigadores franceses do INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) (Daufin *et al.*, 1998). A expansão destas tecnologias pelos vários sectores da indústria alimentar ou nas agroindústrias tem sido bastante rápida, sendo já numerosas as suas aplicações na indústria de sumos de frutos e legumes, em vinhos e outros produtos derivados da uva, na clarificação da cerveja, no tratamento de cereais, na valorização de proteínas de peixe e de outros produtos marinhos (Daufin *et al.*, 1998).

Apesar das vantagens da utilização das tecnologias de membranas sobre outros processos concorrentes, já referidas na introdução desta tese, uma limitação destes processos é, por vezes, a intensidade dos fenómenos de polarização de concentração e colmatação, nomeadamente no caso das operações que envolvem fluxos de permeação mais elevados, como é o caso da microfiltração e ultrafiltração de alimentações complexas, como sejam o leite e outros produtos derivados da transformação do leite (Macedo, 2010).

## 1.5 Processos de separação por membranas controlados pela pressão

Os processos de separação por membranas baseiam-se na utilização de membranas, as quais são barreiras seletivas entre duas fases (alimentação/concentrado ou retentado ou retido) e permeado. A membrana permite a permeação preferencial de um componente (ou componentes) da mistura da alimentação, conduzindo à sua separação, concentração ou purificação, a Figura 1 representa esquematicamente o processo de separação com membrana.



**Figura 1 - Representação esquemática de um processo de separação com membrana**

O transporte de massa através da membrana pode ser efetuado por difusão e/ou convecção, induzido por ação de forças motrizes, como por exemplo, gradientes de pressão, de temperatura, de concentração ou de potencial elétrico.

Os processos de separação por membrana controlados pela pressão são aqueles cuja força motriz aplicada é a pressão. Estes processos podem ser agrupados em dois subgrupos: os que ocorrem a pressões mais baixas, como é o caso da microfiltração (MF) e da ultrafiltração (UF), e os que necessitam da aplicação de pressões mais elevadas, como a nanofiltração (NF) e a osmose inversa (OI). Várias centenas de milhares de metros quadrados de área de membrana estão atualmente a operar em todo o mundo, sendo que a maior parte desta área corresponde aos processos de separação por membrana controlados pela pressão: ultrafiltração (35%), microfiltração (33%), nanofiltração e

osmose inversa (30%) (Lipnizki, 2010). A maior parte das aplicações atualmente existentes encontra-se na indústria de laticínios (concentração de proteína do soro, padronização da proteína do leite), logo seguidas das indústrias de bebidas (vinho, cerveja, vinagre, sumos de fruta) e ovoprodutos. Na Tabela 4 são apresentadas algumas características dos principais processos de separação por membranas controlados pela pressão

**Tabela 4- Algumas características dos processos de separação com membranas controlados pela pressão**

<b>Processo/<math>\Delta P</math></b>	<b>Retentado</b>	<b>Permeado</b>	<b>Aplicações</b>
MF/ $\Delta P < 2$ bar	Bactérias, vírus, matéria gorda, partículas em suspensão, água	Solutos dissolvidos, colóides, água	Esterilização a frio, desnate, produção de concentrados de proteína de leite (MPC), clarificação de vinhos, etc.
UF / 1-10 bar	Macromoléculas (proteínas, polissacáridos), água	Moléculas pequenas (mono e dissacáridos), água	Separação de macromoléculas, produção de MPC; padronização do teor de proteína do leite; clarificação nas indústrias de produção de vinho, vinagre, etc.
NF / 10-25 bar	Solutos dissolvidos (moléculas pequenas) e principalmente iões bivalentes, água	Solutos dissolvidos, água	Concentração e desmineralização parcial do soro e/ou de concentrados proteicos de soro, separação de pequenos açúcares; dessalinização/amaciamento de água de processo
OI / 15-25 ou 40-80 bar	Todos os solutos, água	Água	Dessalinização, produção de gelados a partir de leite magro, separação/concentração de lactose; desalcoolização da cerveja e do vinho, concentração de sumos; produção de concentrado de tomate etc.



Quando se progride no sentido microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa, o tamanho ou a massa molar das partículas ou moléculas que são retidas pela membrana diminui e, conseqüentemente, o tamanho dos poros e a porosidade também decresce. Isto significa que a resistência hidrodinâmica das membranas à transferência de massa vai sendo cada vez maior, sendo pois necessárias pressões aplicadas maiores para se conseguirem os mesmos fluxos de permeação.

Os mecanismos de separação são também diferentes. Em geral, a seletividade das membranas de MF está associada a exclusão por tamanho molecular, enquanto nas membranas de OI, a seletividade é principalmente controlada pela difusão/solubilidade do (s) soluto (s) /solvente. Nas membranas de UF e NF, ambos os mecanismos referidos, contribuem para a sua seletividade, muito embora com a prevalência da exclusão molecular no caso das membranas de UF e do mecanismo difusivo, no caso das membranas de NF (Macedo, 2013).

## **1.6 Ultrafiltração: fundamentos**

A ultrafiltração situa-se entre a microfiltração e a nanofiltração, sendo principalmente usada para a separação de macromoléculas de uma solução, com massas molares mínimas de alguns milhares de daltons ( $\text{g mol}^{-1}$ ). As membranas de ultrafiltração, tal como as de microfiltração, podem ser consideradas como membranas porosas cuja rejeição é principalmente determinada pelo tamanho e forma dos solutos em relação ao tamanho do poro da membrana. No entanto, uma diferença importante entre os dois processos é o facto das membranas de UF possuírem uma estrutura assimétrica com uma camada ativa muito mais densa, o que significa que o tamanho de poro e a porosidade é muito menor, pelo que a sua resistência hidrodinâmica é muito mais elevada (são necessárias pressões mais elevadas).

O fluxo volumétrico de água pura,  $J_w$ , através da membrana é diretamente proporcional à pressão transmembranar aplicada, de acordo com a equação:

$$J_w = \frac{L_p}{\mu} \times \Delta P \quad (1)$$

Onde:  $(L_p/\mu)$  é a permeabilidade hidráulica da membrana;  $L_p$  é a permeabilidade hidráulica intrínseca da membrana;  $\Delta P$ , a pressão transmembranar aplicada e  $\mu$ , a viscosidade do permeado.

A permeabilidade hidráulica intrínseca da membrana é uma característica sua e depende de vários fatores estruturais, tais como, porosidade, tamanho de poro e distribuição de tamanho de poros.

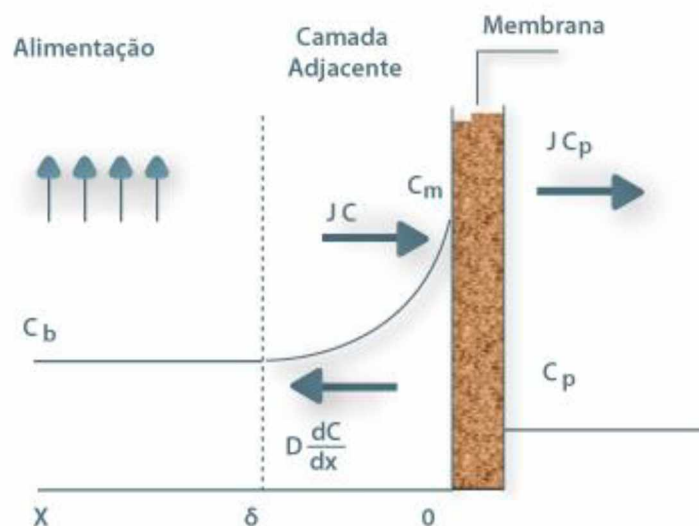
Quando a água pura é substituída por soluções complexas, como por exemplo soluções de proteínas, observa-se uma variação não-linear dos fluxos de permeado ( $J_v$ ) com a pressão transmembranar aplicada, apresentando as curvas um comportamento assintótico característico (Figura 2).



**Figura 2- Variação do fluxo de permeado com a pressão transmembranar aplicada (adaptado de Cheryan, 1998).**

Na figura 2 verifica-se que para baixas pressões os fluxos de permeado variam linearmente com a pressão aplicada, de modo semelhante aos fluxos de água pura. Para pressões elevadas o fluxo de permeado fica aproximadamente constante, atingindo-se o que é habitualmente designado por patamar limite. Quando se atinge este patamar limite, o aumento de pressão não se traduz em qualquer aumento dos fluxos de permeação, uma vez que o processo de separação passa a ser controlado pela transferência de massa na camada adjacente à membrana.

Na camada de fluido adjacente à membrana, como resultado do gradiente de pressão normal aplicado, a alimentação é transportada em direção a esta membrana, a qual é permeada pelo solvente, rejeitando parcialmente o soluto. O soluto que é retido acumula-se à superfície da membrana, até que, em estado estacionário, o fluxo convectivo de soluto em direção à membrana é equilibrado pelo fluxo de soluto através da membrana e pelo fluxo difusivo de soluto da superfície da membrana em direção ao seio da alimentação. Desta forma, estabelece-se um perfil de concentrações numa camada adjacente à superfície da membrana de espessura  $\delta$ , designando-se este fenómeno por Polarização de Concentração apresentado na Figura 3.



**Figura 3** - Polarização de concentração (adaptado de Mulder,1998).

Um balanço de massa ao soluto num elemento diferencial de volume no seio da camada de espessura  $x = \delta$ , adjacente à membrana, conduz à equação:

$$J C - D \frac{dC}{dx} = J C_p \quad (2)$$

com as condições fronteira:  $x = 0 \quad C = C_m$

$$x = \delta \quad C = C_b$$

A integração da equação (2) nas condições fronteiras especificadas permite a obtenção da equação:

$$\frac{C_m - C_p}{C_b - C_p} = \exp\left(\frac{J_p \delta}{D}\right) \quad (3)$$

A razão entre o coeficiente de difusão  $D$  e a espessura da camada limite  $\delta$  designa-se por coeficiente de transferência de massa,  $K$ . Substituindo esta razão por  $K$  na equação (3) e exprimindo-a em ordem ao fluxo de permeado  $J_v$ , obtém-se:

$$J_v = K \ln\left(\frac{C_m - C_p}{C_b - C_p}\right) \quad (4)$$

A qual permite prever o fluxo de permeado na região de pressão controlada pela transferência de massa (patamar limite) da Figura 3.

Se a membrana utilizada for totalmente retentiva então  $C_p = 0$  e a razão:

$$\frac{C_m}{C_b} = \exp\left(\frac{J_v}{K}\right) \quad (5)$$

designa-se por módulo de polarização de concentração e permite avaliar a intensidade deste fenómeno.

A equação (5) permite verificar que os fatores que mais influenciam o fenómeno da polarização por concentração são o fluxo de permeação ( $J_v$ ) e o coeficiente de transferência de massa ( $K$ ). A formação de uma camada de polarização por concentração conduz à diminuição dos fluxos de permeado, uma vez que ela constitui uma resistência adicional ao transporte de massa através da membrana. Este fenómeno é muito importante em MF e UF devido aos fluxos de permeação serem mais elevados do que em NF e OI, contribuindo para a diminuição da eficiência destes processos.

Para além do fenómeno da polarização por concentração, também a colmatação das membranas, devido principalmente ao bloqueamento dos poros e a interações físico-químicas soluto-membrana, contribui para a diminuição dos fluxos de permeado, afetando assim a eficiência das operações com membranas.

### **1.6.1 Diafiltração**

Os processos de separação com membranas, tais como a MF, NF, UF e OI, podem ser conduzidos no modo de operação designado por diafiltração. Esta técnica promove a remoção de contaminantes de menor massa molar, a partir das soluções que os contêm, através da adição de um solvente puro (como por ex. água ou uma solução tampão) (Yee *et al.*, 2007).

A diafiltração é frequentemente utilizada após a ultrafiltração, para a preparação concentrados proteicos de soro com teores elevados de proteína. Este processo permite a produção de CPS com elevado teor proteico, uma vez que a adição de água ao retentado aumenta a permeação de espécies não proteicas (como a lactose e sais) através da membrana, aumentando assim a concentração das proteínas no retentado (Baldasso, 2011)

A diafiltração pode ser realizada em dois modos distintos de operação: em contínuo e em descontínuo. No modo contínuo, as correntes de concentrado e permeado

são continuamente recolhidas, enquanto ocorre a adição do solvente (água), enquanto no modo descontínuo, ou *batch*, o concentrado é reciclado para o tanque de alimentação e o permeado é recolhido. A operação em descontínuo é geralmente utilizada ao nível laboratorial ou à escala piloto, dado que é a configuração mais simples e requer uma menor área de membrana, para atingir um dado grau de separação. Por outro lado, a operação em contínuo é mais usada ao nível industrial, em sistemas com grande capacidade de produção, requerendo uma área de membrana elevada (Cheryan, 1998).

### **1.6.2 Aplicações da ultrafiltração em laticínios**

A maior aplicação da ultrafiltração na indústria de laticínios é a produção de concentrados proteicos de soro (CPS), os quais são normalmente produzidos industrialmente com um grau de pureza entre 35%-95% (proteína/extrato seco), por ultrafiltração combinada com um pré-tratamento de clarificação/delipidação. Os concentrados proteicos de pureza mais elevada (entre 90 a 95%) designam-se por isolados de proteína de soro (IPS) e preparam-se principalmente por cromatografia de troca iónica e/ou ultrafiltração seguida de diafiltração (Dauvin *et al.*, 1998). Os concentrados proteicos têm um valor comercial que é cerca de 3-10 vezes superior ao do soro em pó (Mangino, 1992), não só devido ao seu valor nutritivo, como também às suas excelentes propriedades funcionais, como solubilidade numa ampla gama de pH, gelificação, retenção de água, formação de espuma/aeração e incremento da viscosidade, melhorando também as propriedades reológicas (Maubois, 1997).

Na indústria alimentar, os concentrados e isolados proteicos de soro podem ser utilizados como aditivos em alimentos cozinhados, em produtos da indústria de laticínios, em carnes, bebidas e alimentos infantis (Zydney, 1998). A incorporação de concentrados proteicos de soro no fabrico de queijo permite aumentar o rendimento da sua produção (Maubois, 1997).

As proteínas de soro concentradas são amplamente utilizadas no desenvolvimento de fórmulas de bebidas proteicas nutricionais e outros produtos nutricionais de uso médio (Sgarbieri, 2004). A utilização destes concentrados por desportistas e pessoas fisicamente ativas, que necessitam de uma maior quantidade de proteínas relativamente a indivíduos sedentários, tem vindo a ser intensificada. A ingestão controlada destes concentrados

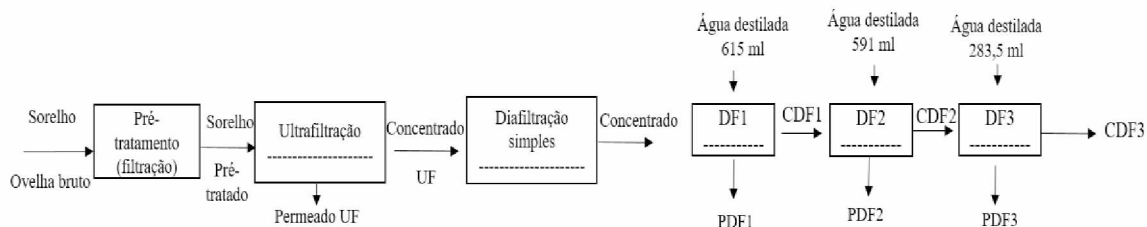
favorece o anabolismo muscular, devido ao seu elevado teor em aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (Van Loon, 2000); (Haraguchi *et al.*, 2006), quer através da redução da gordura corporal, por mecanismos associados ao cálcio e também devido à presença de concentrações elevadas de aminoácidos de cadeia ramificada (Haraguchi *et al.*, 2006). Por outro lado, como apresentam um teor de gordura menor que 2% e baixo conteúdo em lactose podem ser usados como fonte de cálcio, em substituição do leite, em pessoas intolerantes à lactose (Haraguchi *et al.*, 2006).

## **Capítulo 2 - Parte experimental**

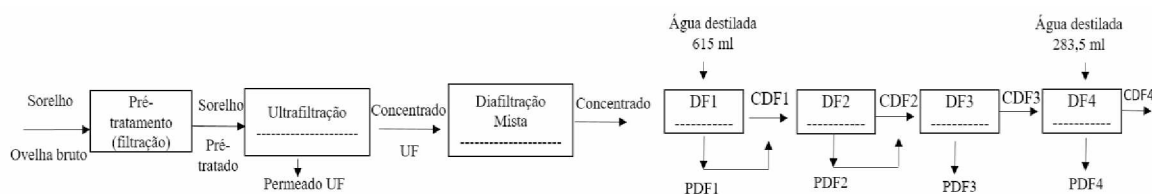
### **2.1 Introdução**

O trabalho experimental envolveu a realização de ensaios de ultrafiltração em dois modos de operação: concentração e diafiltração a volume variável. Estes ensaios foram realizados, em modo de concentração até um fator de concentração em volume (FCV) de 2,0, com membranas RC70PP (peso molecular de corte de 10 kDa) e ETNA 01 PP (peso molecular de corte 1kDa), nas mesmas condições operatórias de pressão, caudal de circulação e temperatura, respetivamente 2,0 bar, 10 Lmin<sup>-1</sup> e 25°C, tendo-se realizados dois ensaios deste tipo com ambas as membranas. Os ensaios de diafiltração foram realizados com os mesmos dois tipos de membranas, a volume variável e, cada um deles envolveu uma sequência de quatro etapas. Esta sequência de quatro etapas foi executada de dois modos diferentes: só com adição de água desionizada em todas as etapas (ensaios simples) e com adição de água e do diafiltrado obtido na etapa anterior, de uma forma intercalada (ensaios mistos). Cada um deste tipo de ensaios foi realizado em duplicado, com ambas as membranas. O desempenho das membranas foi determinado em termos de fluxos de permeado e coeficientes de rejeição aparente aos sólidos totais, sais, proteína total e lactose.

A Figura 4 ilustra um diagrama esquemático das operações envolvidas no trabalho experimental: é apresentado o processo de UF/DF simples e na Figura 5, o processo de UF/DF misto.



**Figura 4- Diagrama do processo UF/DF simples**



**Figura 5- Diagrama do processo UF/DF misto**

## 2.2 Membranas

As membranas de ultrafiltração testadas foram comercializadas pela empresa Alfa-Laval, da Dinamarca, e são caracterizadas por serem membranas compósitas, porosas e de natureza orgânica. Algumas características destas membranas estão indicadas na Tabela 1 seguinte. Ambas as membranas utilizadas são de natureza hidrofílica (Macedo *et al.*, 2015), a fim de evitar colmatações graves pelas proteínas. Considerando que em ultrafiltração o mecanismo principal de separação é a exclusão molecular, ou seja, os componentes de maior peso molecular são retidos, enquanto os restantes permeiam a membrana, a seleção das membranas para este trabalho teve, por base, as massas molares das principais proteínas do soro,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, 18,3 e 14,2 kDa (Walstra and Noomen, 2001). A  $\beta$ -lactoglobulina apresenta-se, à temperatura ambiente e no intervalo de pH entre 5,2 – 7,0 na forma de dímero, ao qual corresponde, portanto, uma massa molar de 36,6 kDa (Cayot and Lorient, 1998).



**Tabela 5- Algumas características das membranas fornecidas pelo fabricante**

<b>Características</b>	<b>Membrana</b>	
	<b>RC70PP</b>	<b>ETNA01PP</b>
Material	Acetato de celulose regenerado sobre polipropileno	Fluoreto de polivinilideno modificado sobre polipropileno
Peso molecular de corte (MWCO), kDa	10	1
Limites de pressão (bar)	1 - 5	1 - 5
Limites de temperatura (°C)	0- 60	0 - 65

## 2.3 Material

### 2.3.1 Sorelho

Ao longo do trabalho colheram-se periodicamente, durante um período de 4 meses, amostras de sorelho fornecidas pela queijaria Alvito, localizada na região de Beja. O sorelho é proveniente do fabrico de requeijão de ovelha. Este é um queijo de soro resultante da precipitação térmica das proteínas do soro, a uma temperatura de aproximadamente 90°C. Um fluxograma que ilustra o processo de fabrico artesanal de requeijão e produção de sorelho é apresentado na Figura 6.

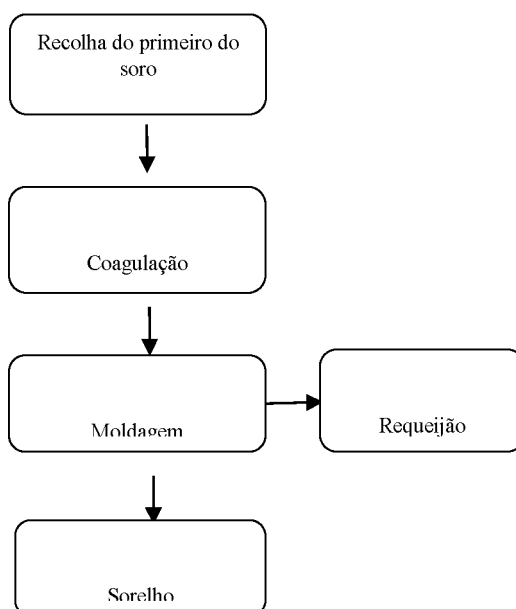


Figura 6- Fluxograma do processo de fabrico artesanal de requeijão e produção de sorelho

### 2.3.2 Amostragem e armazenamento das amostras

As amostras foram recolhidas imediatamente após o fabrico do requeijão e foram posteriormente transportadas para o laboratório.

Sempre que o sorelho não podia ser utilizado no dia seguinte era congelado, em câmara de congelação à temperatura de -27°C. De um dia para outro foi mantido na refrigeração, à temperatura de 4°C. As amostras recolhidas após o processo de ultrafiltração foram

conservadas com adição de azida de sódio, para evitar a sua contaminação, a fim de poderem posteriormente ser utilizadas em aplicações alimentares.

### **2.3.3 Pré-tratamento das amostras**

Neste trabalho, o sorelho, imediatamente após a sua chegada ao laboratório, foi filtrado, duas vezes, através de panos de algodão, a fim de remover os sólidos em suspensão, contribuindo assim para minimizar a colmatção das membranas.

### **2.3.4 Métodos analíticos utilizados na caracterização físico-química das amostras**

Os parâmetros determinados em todas as amostras (sorelho inicial, sorelho pré-tratado, retentados e permeados) foram os seguintes: pH, condutividade elétrica (CE), matéria gorda, lactose, sólidos totais e proteína bruta.

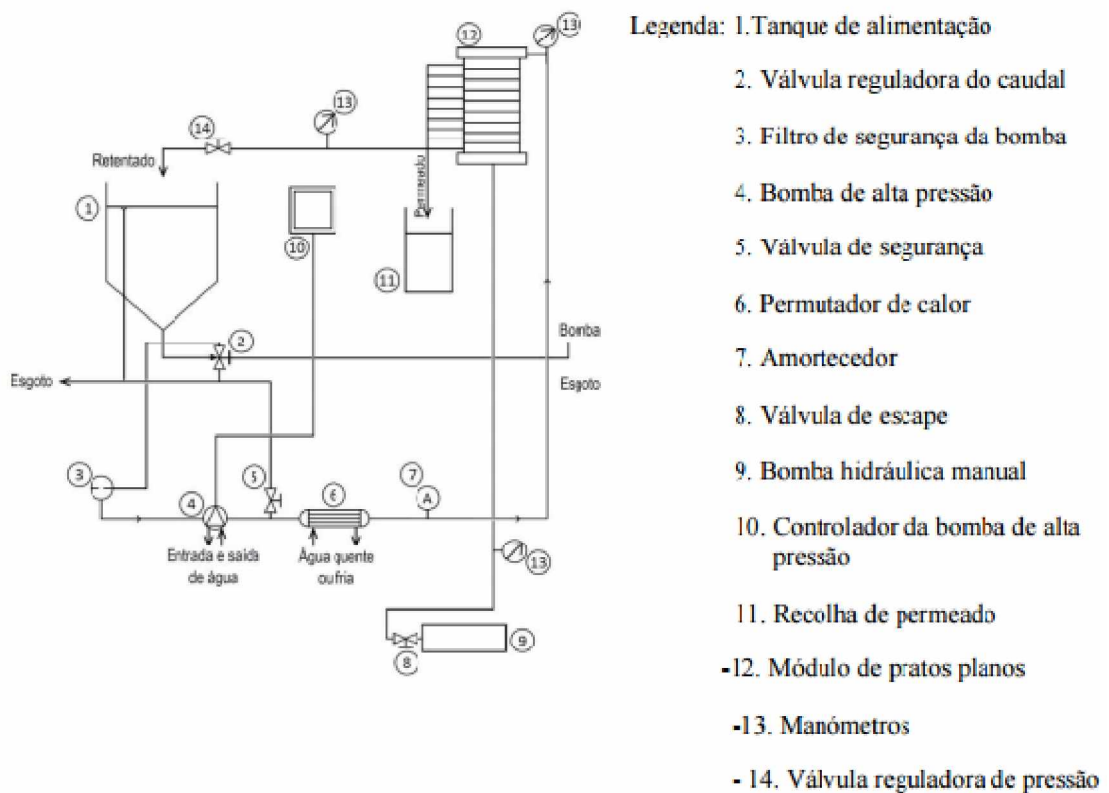
O pH é um dos parâmetros fundamentais a analisar porque permite avaliar a estabilidade físico-química do sorelho ao longo dos ensaios, garantindo que a qualidade da amostra se mantém constante durante o ensaio. O pH foi medido por potenciometria, utilizando um potenciômetro de bancada, Metrohm 744 pH, o qual foi previamente calibrado com soluções tampão pH = 4,0 e pH=7,0, à temperatura de 25°C.

A condutividade elétrica é uma medida da concentração iônica, permitindo avaliar a concentração dos sais iônicos presentes em solução. A condutividade elétrica foi medida por condutimetria, à temperatura de 20°C, utilizando um condutímetro da marca Metrohm. O condutímetro foi previamente calibrado com soluções de cloreto de potássio diluídas. A fim de converter os valores de condutividade obtidos em concentrações de sais prepararam-se soluções padrão diluídas de cloreto de sódio (NaCl), nas quais se mediram as respectivas condutividades. A partir das retas de calibração obtidas com os valores das condutividades em função das respectivas concentrações, determinaram-se as concentrações de sais (Anexo).

As determinações da matéria gorda, lactose, sólidos totais e proteína foram realizadas por espectrofotometria de infravermelhos, no MilkoScan, modelo: 133B, previamente calibrado com os métodos de referência, para cada um dos parâmetros analisados.

## 2.4 Equipamento

Utilizou-se uma instalação piloto comercial, Lab-unit 20, da Alfa Laval , Dinamarca , com uma área superficial de membranas que pode variar entre 0.036m<sup>2</sup> e 0.72 m<sup>2</sup>. Esta instalação permite operar em ensaios de MF, UF, NF e OI, pelo que possui dois conjuntos de manómetros para operar a gamas de pressão distintas: a baixas pressões (para MF e UF) e pressões elevadas (NF e OI). A Figura 7 representa esquematicamente a instalação.



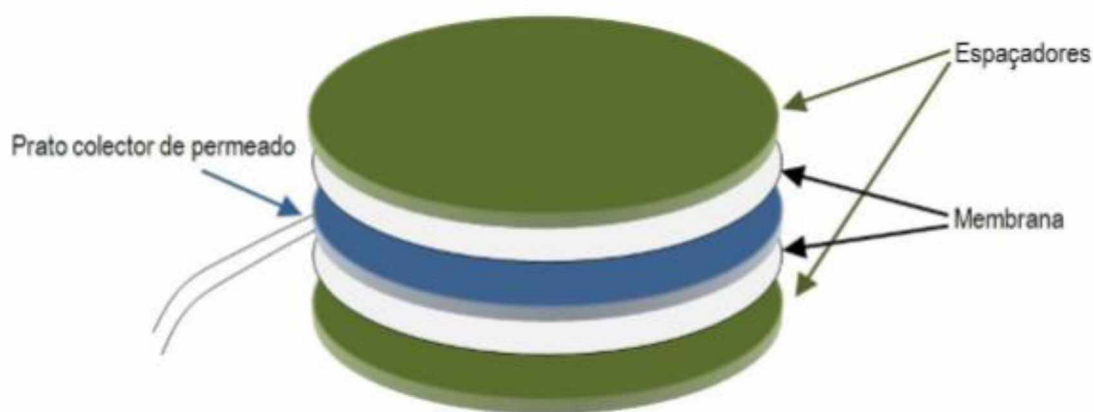
**Figura 7- Representação esquemática da instalação Lab-unit M20, adaptado (Macedo, 2010)**

O módulo de membranas apresenta pratos circulares planos e faz parte da célula de permeação. As membranas agrupam-se aos pares, onde ambas assentam na parte superior e inferior de um mesmo prato coletor de permeado. Os pratos são separados por espaçadores, que funcionam como câmaras de alimentação de 0.5 mm de altura, e encontram-se divididos em 30 canais, o que proporciona um escoamento uniforme, melhorando a transferência de massa na camada adjacente à membrana. A membrana é

constituída por uma camada porosa e uma ativa. Quando colocada no módulo apresenta a parte porosa assente no prato coletor e a ativa no espaçador. Colocou-se entre cada membrana e o prato coletor papel de filtro, o qual não oferece resistência à passagem do fluido e impede que a membrana fique presa ao prato coletor. Em cada prato existe um tubo coletor para o permeado, o que permite testar diferentes membranas em simultâneo.

A área de cada membrana circular plana é de  $0.018\text{m}^2$ , sendo o número máximo de pratos a utilizar de 20 ( $0.72\text{ m}^2$ ). Neste ensaio foram utilizados dois pares de membranas, pelo que a área superficial de membrana utilizada foi de  $0.072\text{ m}^2$ . Os pratos de suporte e os espaçadores são constituídos de polissulfona e a estrutura do módulo é de aço inoxidável, sendo por isso adequado para trabalhar com fluidos alimentares.

A unidade apresenta um sistema hidráulico que permite comprimir o módulo de pratos, tornando-se estanques. A Figura 8 apresenta o esquema da unidade básica do módulo de membranas.



**Figura 8- Unidade básica da célula de permeação da instalação Lab-unit M20 (Macedo, 2010)**

#### **2.4.1 Procedimento e condições operatórias**

O conjunto de 2 pares de membranas foram montadas no módulo e comprimidas até uma pressão igual ou inferior 50MPa, de acordo com as especificações indicadas no Manual do fabricante. A seguir à compressão dos módulos das membranas procedeu-se a um ciclo de lavagem e desinfeção, designado por CIP (Cleaning In Place), durante o qual a instalação funcionou em modo de recirculação total (o concentrado e permeado são

devolvidos ao tanque de alimentação), permeando em primeiro lugar água desionizada, a fim de remover o material de proteção que se encontra na superfície das membranas e , de seguida recorreu-se a um conjunto de reagentes de limpeza e desinfecção, adequados às características das membranas (no subcapítulo 3.4.2 encontra-se detalhado o sistema CIP).

Após a realização do CIP, realizou-se a compactação das membranas. Esta etapa consiste em permear água desionizada, em modo de recirculação total, durante um período mínimo de 3 horas, a uma pressão 20% superior à pressão de trabalho máxima a utilizar nos ensaios posteriores. Este procedimento consiste em minimizar alterações da estrutura das membranas durante os ensaios.

O procedimento geral de funcionamento da instalação envolveu quatro fases:

- ✓ Arranque;
- ✓ Estabilização;
- ✓ Recolha de amostras;
- ✓ Finalização da operação;

Para o arranque é necessário verificar que a torneira da água se encontra aberta, o que permite a refrigeração da bomba. Quando se trabalha em modo de recirculação total, é necessário verificar se os coletores de permeado e o tubo de alimentação estão devidamente colocados na cuba. Antes do arranque, a válvula reguladora de pressão é parcialmente fechada, com duas voltas e meia, para evitar picos de pressão e ocorrência de danos nas membranas. Posteriormente, coloca-se a bomba em funcionamento, ajustando a velocidade de circulação até atingir os 26.4 Hertz, com um caudal de circulação de 10 L min<sup>-1</sup>. De seguida ajusta-se a pressão, fechando lentamente a válvula reguladora da pressão, até atingir a pressão desejada.

O período de estabilização das condições operatórias decorre em modo recirculação total, durante 30 minutos para que as condições operatórias, como a pressão, caudal de circulação e temperatura, sejam estabilizadas.

#### **2.4.2 Lavagem e desinfecção das membranas**

O procedimento de lavagem e desinfecção das membranas é realizado antes e depois dos ensaios, respeitando os limites de pressão, temperatura, pH, concentrações de reagentes de limpeza e desinfecção, de acordo com o tipo de membrana. Este processo permite restituir as características dos fluxos de permeado, pelo menos 90% do fluxo inicial de permeado, e de rejeição da membrana, para além de prevenir contaminações microbiológicas.

Inicialmente, as membranas foram sujeitas a duas lavagens sucessivas com água desionizada de qualidade adequada, as quais foram executadas à pressão de  $1.5 \times 10^5$  Pa. De seguida, permeou-se uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,01%, durante 10 minutos, verificando primeiro se o pH da solução se encontrava entre 1 e 11 (intervalo de pH permitido para as membranas ensaiadas). Após esta etapa removeu-se a solução alcalina da instalação e enxaguou-se com água desionizada, até restaurar o pH da água desionizada, para garantir que todo o NaOH foi removido das tubagens. Na etapa da desinfecção fez-se recircular uma solução de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) de concentração 1000 ppm, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

No entanto, se este processo de lavagem e desinfecção não se revelar eficaz, ou seja, se a permeabilidade da membrana após este ciclo for inferior a 90% da inicial, recorre-se a um CIP completo. Neste ciclo completo, de acordo com as instruções do fabricante, recorre-se ao uso de outros reagentes. Os reagentes utilizados devem ser compatíveis com o material de fabrico das membranas e os limites das condições normais de operação não devem ser excedidos durante a limpeza, o que evita danos irreversíveis nas membranas. Na lavagem completa utiliza-se NaOH, seguida de uma solução NaO-EDTA a 0,2%,  $HNO_3$  a 25%, ácido cítrico a 0,5% e desinfecção com  $H_2O_2$ . Nesta etapa, entre duas limpezas sucessivas com reagentes, faz-se um enxaguamento com água desionizada, para remover quaisquer resíduos das tubagens.

## 2.5 Ensaios de permeação

### 2.5.1 Determinação da permeabilidade hidráulica das membranas

A permeabilidade hidráulica das membranas foi determinada através da medição dos fluxos de água pura (desionizada) a várias pressões transmembranares, no intervalo entre 0,6 e 4,0 bar, a um caudal de circulação de 10,0 L min<sup>-1</sup>. Os fluxos experimentais de água pura ( $J_w$ ) foram calculados através da equação:

$$J_w = \frac{V_p}{A \times t} \quad (6)$$

onde:  $V_p$  é o volume de permeado (água desionizada) recolhido, em L;  $A$  é a área de membrana utilizada (m<sup>2</sup>) e  $t$  o tempo (h).

A representação gráfica dos fluxos de permeado em função da pressão transmembranar aplicada permitiu a determinação da permeabilidade hidráulica das membranas, a partir do declive da reta de calibração de ordenada na origem nula, de acordo com a equação (1), apresentada na seção 1.6 . A permeabilidade hidráulica é uma característica das membranas que está relacionada com a sua estrutura (tamanho de poro, distribuição de tamanhos de poro, porosidade). O seu conhecimento é fundamental para avaliar a estabilidade das membranas durante os ensaios. Assim, antes e depois dos ensaios experimentais (após lavagem e desinfeção) deve medir-se a permeabilidade hidráulica das membranas usadas, a fim de verificar se o seu estado se mantém ou qual o seu grau de colmatção, o qual afeta a eficiência do processo. Neste trabalho, após a lavagem e desinfeção das membranas, mediu-se o fluxo de água desionizada, nas condições de trabalho (pressão transmembranar de 2,0 bar, caudal de circulação de 10,0 L min<sup>-1</sup> e temperatura 25 °C) e considerou-se que o seu estado se mantinha quando o fluxo medido era, no mínimo, 90% do fluxo inicial de água pura de membranas novas.



### 2.5.2 Ensaaios de ultrafiltração

Os ensaios de ultrafiltração com soro de leite pré-tratado foram realizados em modo de concentração, isto é, o permeado é recolhido enquanto o retentado é recirculado para a cuba de alimentação, o que permite a sua concentração. Os ensaios prosseguiram até um fator de concentração em volume (FCV) de 2,0, tendo sido realizados com membranas RC70PP (peso molecular de corte de 10 kDa) e ETNA 01 PP (peso molecular de corte 1 kDa). Em todas as experiências efetuadas foram usadas as mesmas condições operatórias de pressão, caudal de circulação e temperatura, respetivamente 2,0 bar, 10 L min<sup>-1</sup> e 25°C. Estes ensaios, designados neste trabalho, por ensaios controlo, destinaram-se a avaliar o desempenho da ultrafiltração para separar a fração proteica do soro de leite. Aquele, foi avaliado em termos de fluxos de permeado, ou seja, produtividade, e de coeficientes de rejeição aparente aos principais componentes da matéria seca (lactose, proteína bruta, matéria gorda e sais), a fim de determinar a sua seletividade.

Os ensaios iniciaram-se com a introdução de um volume de soro de leite de 8,75L no tanque de alimentação, o qual permeou as membranas em modo de recirculação total (o concentrado e o permeado retornam ambos ao tanque de alimentação), a um caudal de circulação de 10,0 L/min com frequência ( $f=26.4$  Hz) e a pressão a 2,0 bar, durante 30 minutos, a fim de permitir a estabilização das condições de operação. Após este tempo, mediu-se o fluxo inicial de permeado, recolhendo numa proveta 50 mL de permeado e registando o tempo, pH e temperatura. Iniciou-se então o processo de concentração (apenas o retentado retorna ao tanque de alimentação, sendo o permeado recolhido numa proveta) até um fator de concentração volúmico (FCV) de 2,0, o que correspondeu à recolha de 5,275 L de permeado. O FCV é definido como:

$$FCV = \frac{V_{\text{alimentação}}}{V_{\text{concentrado}}} = \frac{V_{\text{alimentação}}}{V_{\text{alimentação}} - V_{\text{permeado}}} \quad (7)$$

Ao longo dos ensaios, mediram-se os volumes de permeado em vários instantes de tempo, para a determinação dos fluxos instantâneos de permeado, registrando-se também os valores de pH e temperatura. Os fluxos de permeado,  $J_p$ , foram calculados de acordo com a equação (4), previamente apresentada.

Foram colhidas amostras de soro bruto, soro pré-tratado (alimentação), concentrado e permeado final, nas quais se analisaram os componentes referidos.

O coeficiente de rejeição aparente de um dado componente  $i$ ,  $R_i$ , foi utilizado como parâmetro para avaliar a seletividade do processo para a separação dos principais componentes do soro, ou seja, a fração azotada (proteína bruta) e a fração rica em lactose e sais. O coeficiente de rejeição aparente foi calculado da seguinte forma:

$$R_i = \frac{[C_i]_{concentrado} - [C_i]_{permeado}}{[C_i]_{concentrado}} \quad (8)$$

onde:  $[C_i]_{concentrado}$  e  $[C_i]_{permeado}$  representam, respetivamente, a concentração do componente (i) no concentrado e no permeado.

Os coeficientes de rejeição aparente foram calculados para a proteína bruta, lactose, matéria gorda, sólidos totais e sais minerais.

### **2.5.3 Ensaios de diafiltração em modo de ultrafiltração (dia-ultrafiltração)**

Os ensaios de dia-ultrafiltração foram realizados de dois modos diferentes, envolvendo cada um deles uma sequência de quatro etapas: só com adição de água (ensaios simples) e com etapas intercaladas com adição de água e com adição do permeado diafiltrado obtido na etapa anterior (ensaios mistos).

Nos ensaios simples a diafiltração ocorreu em três etapas, nas quais se adicionou um dado volume de água desionizada.

Na 1ª etapa (DF1), ao concentrado obtido para um  $FCV=2,0$ , adicionou-se um volume de água desionizada de cerca de 20% do volume de concentrado observado no tanque, ou seja, 615 mL, tendo-se deixado estabilizar o sistema, em modo de recirculação total, durante 30 minutos. Passado este tempo iniciou-se novo processo de concentração até à recolha de idêntico volume de permeado diafiltrado, de forma a manter o volume de concentrado constante no tanque de alimentação. No final desta etapa, colheu-se uma amostra do concentrado (CDF1) e outra amostra do permeado (PDF1), para analisar, tendo-se imediatamente a seguir introduzido o coletor do permeado no tanque, a fim de manter a concentração.

Na 2ª etapa (DF2), adicionou-se ao concentrado diafiltrado (CDF1), um volume de água desionizada correspondente a 20% do volume observado no tanque (591 ml), tendo-se deixado estabilizar o sistema e as condições operatórias durante 30 minutos, em modo de recirculação total. Iniciou-se então um novo processo de concentração até à recolha de 591 mL de permeado diafiltrado, findo o qual se recolheram duas novas amostras de retentado diafiltrado (CDF2) e de permeado diafiltrado (PDF2) para análises.

Na 3ª etapa (DF3), adicionou-se ao concentrado (CDF2) um volume de água desionizada correspondente a 10% do volume observado no tanque (283,5 mL), tendo-se novamente deixado estabilizar o sistema em modo de recirculação total. De seguida, iniciou-se novo processo de concentração até se obter um volume igual de permeado e recolheram-se amostras do concentrado (CDF3) e permeado (PDF3) respetivo, para análises.

Durante todo o processo de concentração por dia-ultrafiltração, mediram-se os volumes de permeado recolhidos a intervalos de tempo regulares, para a determinação dos fluxos de permeado, assim como o pH e a temperatura.

Os ensaios mistos decorreram em 4 etapas, em duas das quais se adicionou água desionizada e nas outras duas foi adicionado o permeado diafiltrado obtido na etapa anterior.

A 1ª etapa (DF1) foi idêntica à descrita para os ensaios simples, ou seja, adicionou-se ao concentrado resultante da ultrafiltração ( $FCV = 2,0$ ) um volume de água desionizada, correspondente a 20% do volume observado no tanque, tendo-se colhido no final duas amostras (CDF1 e PDF1).

Na 2ª etapa (DF2) adicionou-se ao concentrado que estava no tanque um volume do permeado diafiltrado (PDF1) obtido na etapa anterior de 550 ml, correspondente também a 20% do volume observado no tanque, deixando-se estabilizar o sistema em modo de recirculação total, durante 30 minutos. De seguida, concentrou-se por ultrafiltração até à recolha de um volume idêntico de permeado, colhendo duas amostras (CDF2 e PDF2).

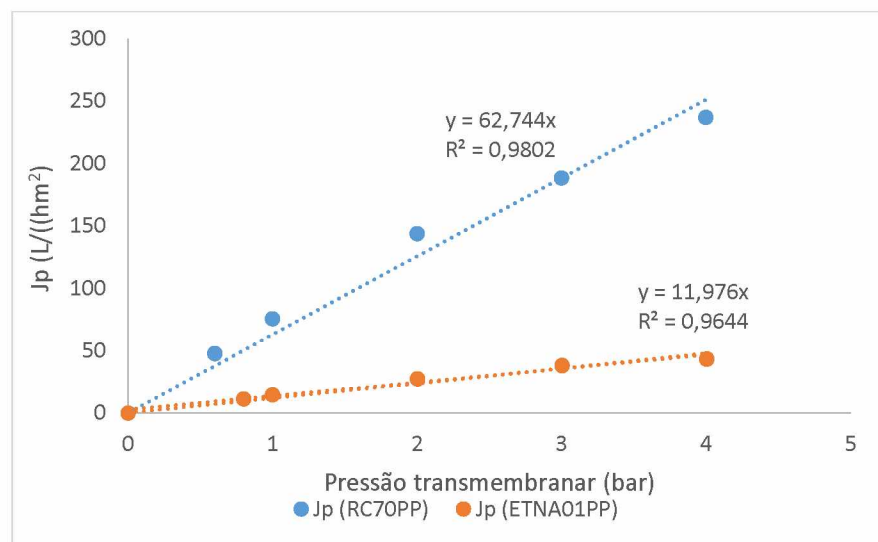
Ao concentrado que estava no tanque adicionou-se um volume do permeado obtido na etapa anterior (PDF2) de 283,5 mL, correspondente a 10% do volume observado no tanque, tendo-se também deixado estabilizar a solução em modo de recirculação total durante 30 minutos. Iniciou-se então um novo processo de concentração por diafiltração (DF3) até à recolha de um volume igual de permeado. Retiraram-se então duas amostras do concentrado e permeado obtidos (CDF3 e PDF3).

Na ultima etapa (DF4), adicionou-se ao concentrado que estava no tanque um volume de 283,5 ml de água desionizada, deixando-se estabilizar a solução em modo de recirculação total durante 30 minutos. Iniciou-se, de seguida, um novo processo de concentração por diafiltração até recolher 283,5 mL de permeado, após o que se retiraram amostras para analisar (CDF4 e PDF4).

## Capítulo 3- Resultados e discussão

### 3.1 Permeabilidade hidráulica das membranas

A permeabilidade hidráulica das membranas foi determinada a partir do declive da reta de calibração obtida quando os fluxos de permeado à água desionizada foram medidos em função da pressão transmembranar aplicada, nas seguintes condições de operação: caudal de circulação = 10,0 L min<sup>-1</sup> e T = 25 °C, de acordo com a Figura 9.



**Figura 9- Variação dos fluxos de permeado à água desionizada com pressão transmembranar aplicada**

Os valores da permeabilidade hidráulica das membranas em estudo estão apresentados na Tabela 6

**Tabela 6- Permeabilidade hidráulica e permeabilidade intrínseca das membranas RC70PP e ETNA01PP**

<b>Membrana</b>	<b>Reta de regressão linear</b>	<b>Permeabilidade hidráulica (<math>L_p/\mu</math>) (<math>m s^{-1} Pa^{-1}</math>)</b>	<b>Permeabilidade hidráulica intrínseca, <math>L_p</math> (m)</b>
RC70PP	$J_p = 62,74 \Delta P$ $r = 0,990$	$1,72 \times 10^{-10}$ (62,74 L h <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> bar <sup>-1</sup> )	$1,53 \times 10^{-13}$
ETNA01PP	$J_p = 11,98 \Delta P$ $r = 0,982$	$3,29 \times 10^{-11}$ (11,98 L h <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> bar <sup>-1</sup> )	$2,93 \times 10^{-14}$

A permeabilidade hidráulica das membranas RC70PP (62,74 L h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> bar<sup>-1</sup>) é muito superior à permeabilidade hidráulica das membranas ETNA 01PP (11,98 L h<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> bar<sup>-1</sup>), o que está de acordo com o tamanho de poro das mesmas, uma vez que os pesos moleculares de corte das membranas RC70PP e ETNA01PP são de 10 kDa e 1 kDa, respetivamente. A permeabilidade hidráulica é um dos parâmetros de caracterização de uma membrana e deve ser sempre determinada em membranas novas e após os ensaios experimentais, pois é um indicador que controla o seu estado.

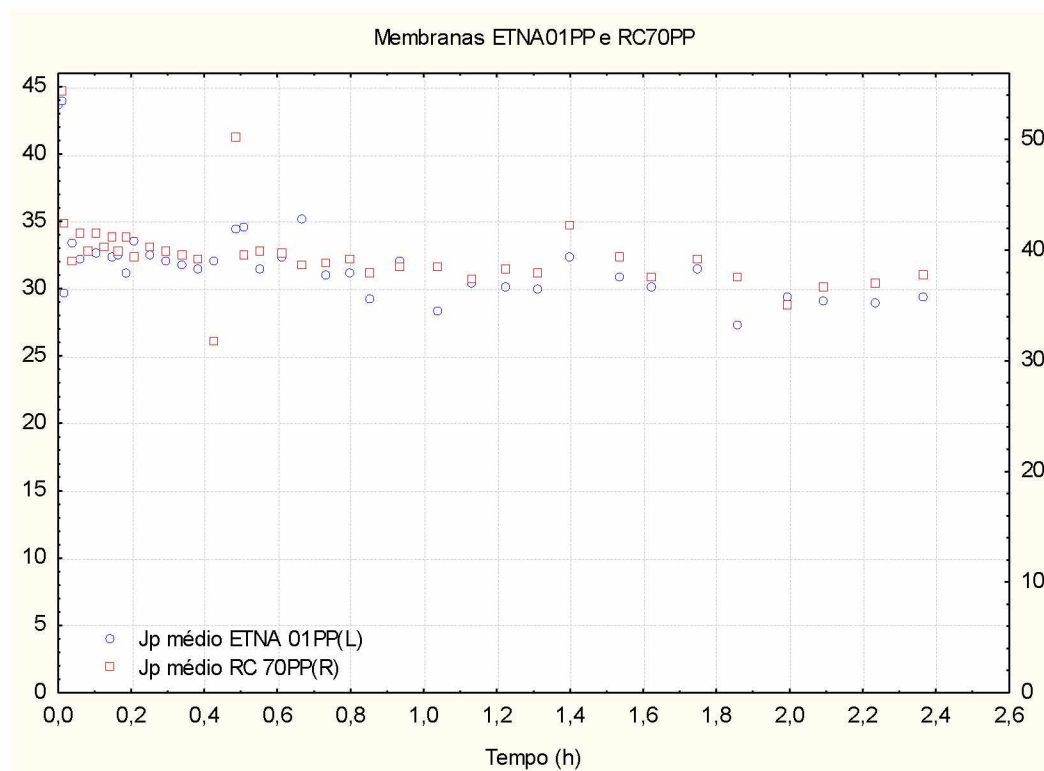
### 3.2 Ensaio de ultrafiltração em modo de concentração

Nesta subsecção são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de concentração nos quais não se realizou a diafiltração (ensaio controlo) para as duas membranas em estudo.

#### 3.2.1 Avaliação da produtividade das membranas em estudo

A variação dos fluxos de permeado médio com o tempo e o FCV, para as membranas RC70PP e ETNA01 PP é apresentada na figura 10. Conforme se pode observar nesta figura, os fluxos de permeado obtidos com as membranas RC70 PP são superiores, sendo a área de membrana utilizada (0,036 m<sup>2</sup>) metade da área usada com as membranas

ETNA01 PP (0,072 m<sup>2</sup>), pelo que a produtividade daquelas membranas é mais elevada. Este resultado é, provavelmente, devido ao diferente tamanho de poro das membranas (10 kDa, no caso das membranas RC70PP e 1 kDa, no caso das membranas ETNA01PP), uma vez que a evolução dos fluxos de permeado com o tempo é semelhante. De facto, observa-se com ambas as membranas um decréscimo acentuado dos fluxos de permeado, apenas nos primeiros instantes, e depois uma estabilização ao longo do tempo, à medida que o processo de concentração prossegue. A diminuição observada inicialmente é provavelmente devida ao fenómeno da concentração de polarização, o qual é relevante nos primeiros instantes, como consequência da acumulação rápida de espécies moleculares junto à membrana. No entanto, a partir de cerca de 1 minuto e 45 segundos, os fluxos de permeado mantêm-se praticamente constantes até ao final do ensaio, apresentando valores médios de  $J_p = 39 \text{ L/h m}^2$  e  $J_p = 31 \text{ L/h m}^2$ , com as membranas RC70PP e ETNA01PP, respetivamente. A estabilização dos fluxos de permeado permite concluir que, até ao FCV estudado, não devem ter ocorrido problemas de colmatção notórios com qualquer uma das membranas. Este facto está provavelmente relacionado com características das membranas, nomeadamente o seu carácter hidrofílico, que tende a minimizar a quantidade de proteína adsorvida sobre as membranas (Macedo *et al.*, 2015).



**Figura 10 - Variação dos fluxos médios de permeado com o tempo nos ensaios controle realizados com ambas as membranas, obtidos até um FCV= 2,0**

### **3.2.2 Caracterização físico-química média dos concentrados e permeados obtidos e avaliação da seletividade**

As caracterizações físico-químicas médias do soro (bruto e filtrado), assim como dos concentrados e permeados obtidos e coeficientes de rejeição aparente aos componentes analisados são apresentadas nas Tabelas 7, 8.

Como se pode observar na Tabela 7, o soro em estudo pode ser classificado como doce dado que o seu pH é superior a 5,6. Comparando os resultados desta caracterização com os que constam na Tabela 3, obtidos por outros autores, verifica-se apenas que o teor de lactose é um pouco superior, enquanto os teores de sólidos totais e proteína são semelhantes. Estas diferenças podem ser atribuídas ao modo artesanal do fabrico do requeijão, do qual resulta o soro.



**Tabela 7 - Caracterização físico-química média do soro com indicação do desvio padrão (n=8)**

<b>Parâmetro</b>	<b>Soro bruto</b>	<b>Soro filtrado (alimentação)</b>
<b>pH (25°C)</b>	5,93 ± 0,27	5,79 ± 0,23
<b>Sólidos totais (% m/m)</b>	6,90 ± 0,06	6,85 ± 0,04
<b>Lactose (% m/m)</b>	5,36 ± 0,06	5,34 ± 0,05
<b>Proteína bruta (% m/m)</b>	0,92 ± 0,03	0,95 ± 0,06

Na Tabela 8 verifica-se que nos concentrados da ultrafiltração obtidos com as membranas ETNA01PP, a concentração de proteína bruta reflete exatamente o fator de concentração volúmico usado ( $FCV = 2,0$ ), enquanto nos concentrados obtidos com as membranas RC70PP, a concentração de proteína bruta é inferior. Esta diferença resulta provavelmente do facto de parte da fração azotada do soro estar na forma de outros compostos azotados de menor massa molar, os quais permearam através destas membranas, devido ao seu maior tamanho de poro.

Ambas as membranas apresentam coeficientes de rejeição aparente elevados à proteína bruta (superiores a 80%), baixos coeficientes de rejeição aparente à lactose (máximo de 5%) e coeficientes de rejeição negativos aos sais, expressos como cloreto de sódio, sal predominante neste tipo de amostras.

No entanto, as membranas de menor tamanho de poro (ETNA01PP) apresentam uma maior seletividade para a separação das frações proteína bruta/lactose, uma vez que o coeficiente de rejeição aparente à proteína é mais elevado (95%) e o da lactose é mais baixo (2,71%). Este resultado poderá ser devido ao facto destas membranas reterem também compostos azotados de massas molares inferiores às proteínas do soro, como por exemplo, caseinomacropéptidos, devido ao seu menor tamanho de poro. Para verificar esta hipótese seria necessário realizar-se uma análise mais detalhada da fração azotada.

O facto de ambas as membranas apresentarem coeficientes de rejeição aparente negativos aos sais deve ser devida à elevada concentração de aniões cloreto, provenientes da adição de sal. Estes, foram preferencialmente permeados através das membranas devido a interações eletrostáticas e ao efeito da pressão aplicada, de forma a manter a eletroneutralidade de ambos os lados da membrana, de acordo com o princípio de exclusão de Donnan.

**Tabela 8- Caracterização físico-química média dos concentrados e permeados com apresentação dos desvios padrão (n=6) e respetivos coeficientes de rejeição aparente (R)**

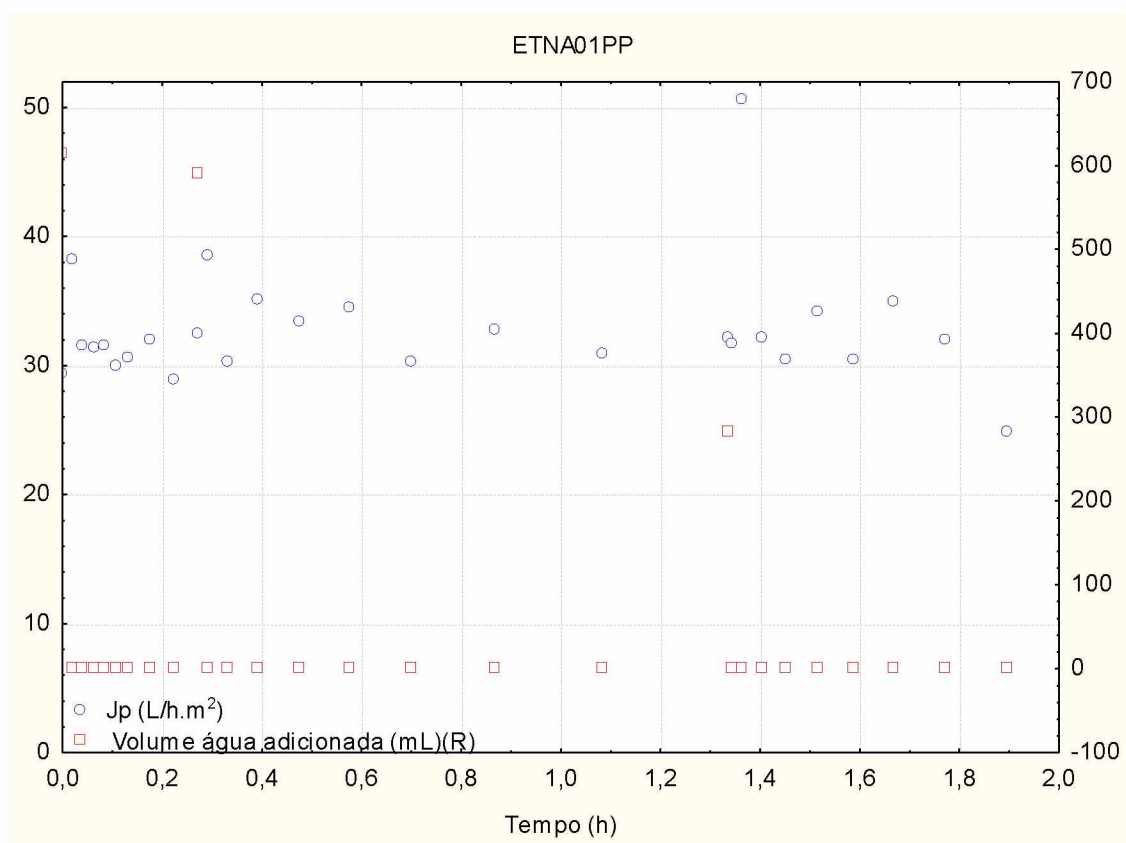
<b>Amostra</b>	<b>Concentração (% m/m)</b>	<b>Membranas</b>		<b>Coeficientes de rejeição aparente, R (%)</b>	
		<b>RC70PP</b>	<b>ETNA01PP</b>	<b>RC70PP</b>	<b>ETNA01PP</b>
<b>Concentrado</b>	Sólidos totais	6,99 ± 0,14	7,64 ± 0,01	20,17	26,80
	Lactose	5,14 ± 0,24	5,16 ± 0,10	5,05	2,71
	Proteína bruta	1,27 ± 0,36	1,80 ± 0,03	82,70	95,00
	Sais (como NaCl)	1,44 ± 0,04	1,46 ± 0,03	- 6,25	-3,42
<b>Permeado</b>	Sólidos totais	5,58 ± 0,01	5,59 ± 0,11		
	Lactose	4,88 ± 0,01	5,02 ± 0,10		
	Proteína bruta	0,22 ± 0,01	0,09 ± 0,04		
	Sais (como NaCl)	1,53 ± 0,02	1,51 ± 0,02		

### **3.3 Ensaio de diafiltração com água desionizada em modo de ultrafiltração**

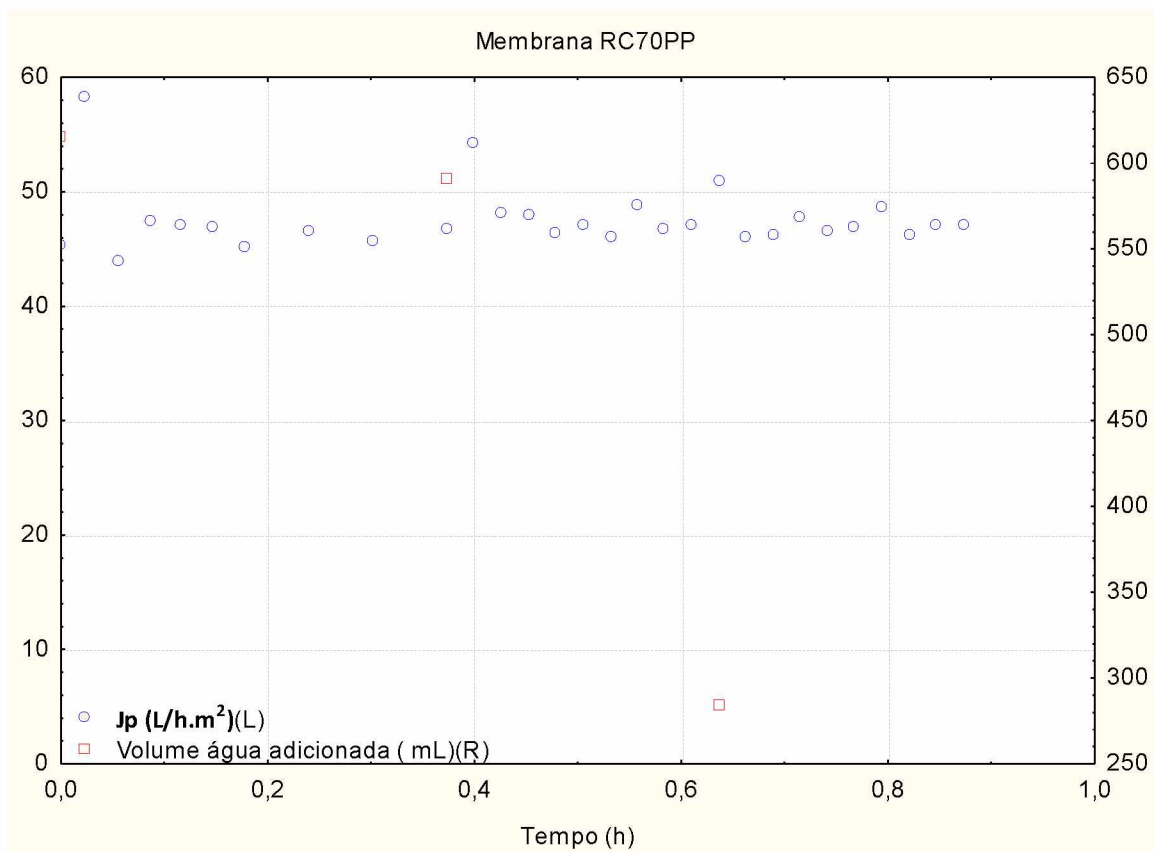
Os resultados destes ensaios, designados por ensaios simples, são apresentados nesta seção.

#### **3.3.1 Variação dos fluxos de permeado com o tempo ao longo da diafiltração simples**

A variação dos fluxos de permeado ao longo das várias etapas da diafiltração, para as duas membranas em estudo é apresentada nas Figuras 11 e 12. Verifica-se que, para ambas as membranas, os fluxos de permeado permanecem praticamente constantes ao longo das várias etapas, observando-se apenas pequenos aumentos, no instante da adição de água desionizada, devido ao efeito da diluição. Comparativamente aos valores obtidos nos ensaios de concentração controlo (Figura 10), constata-se que os fluxos da operação diafiltração em modo de ultrafiltração são próximos, o que significa que a permeação de espécies de menor massa molar, como a lactose e sais, não afeta a produtividade do processo.



**Figura 11- Variação dos fluxos de permeado ao longo do processo de diafiltração simples obtida com as membranas ETNA01P**



**Figura 12- Variação dos fluxos de permeado ao longo do processo de diafiltração simples obtida com as membranas RC70PP**

### 3.3.2 Avaliação das eficiências de remoção durante a diafiltração

Nas figuras 14 e 15 apresentam-se as eficiências de remoção ( $\mu$ ) dos componentes analisados, em relação aos concentrados obtidos, durante as três etapas do processo de diafiltração (DF1, DF2 e DF3), para as duas membranas em estudo. A eficiência de remoção permite avaliar o desempenho da diafiltração na remoção dos componentes de menor massa molar para a corrente do permeado, desta forma contribuindo para a purificação do concentrado. A eficiência de remoção de um dado componente  $i$  ( $\mu_i$ ) foi calculada de acordo com a equação:

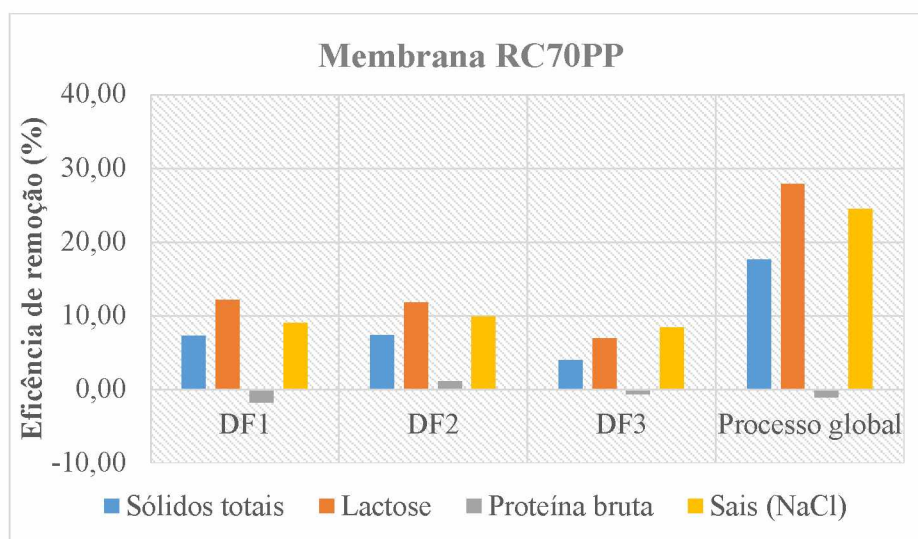
$$\mu_i = \frac{[C_i]_{inicial} - [C_i]_{final}}{[C_i]_{inicial}} \times 100 \quad (9)$$

onde:  $[C_i]_{\text{inicial}}$  é a concentração do componente  $i$  do concentrado inicial (antes de cada etapa de diafiltração) e  $[C_f]_{\text{final}}$  é a concentração do componente  $i$  do concentrado final (após cada etapa de diafiltração).

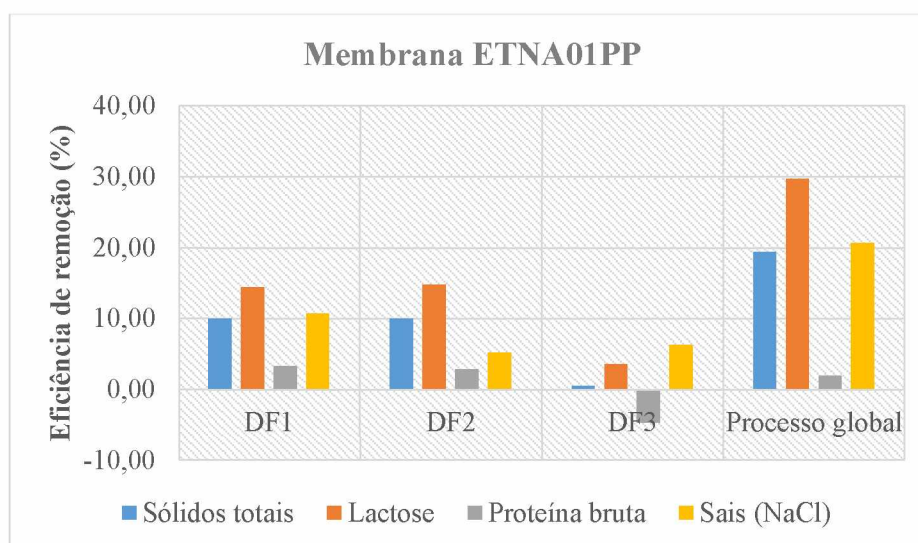
Em ambas as figuras apresentam-se também as eficiências do processo global de dia-ultrafiltração, obtidas a partir das concentrações iniciais (antes do processo) e final (no fim do processo) de um dado componente ( $i$ ).

Verifica-se, com ambas as membranas, que no processo de dia-ultrafiltração, as primeiras duas etapas permitiram uma maior remoção da lactose, dos sais e, consequentemente dos sólidos totais. Este resultado é possivelmente devido ao facto de se ter reduzido o volume de água de diafiltração na terceira etapa do processo (metade da água usada nas duas etapas anteriores). Assim, apesar do consumo de água total ter sido menor, a eficiência do processo também foi reduzida.

Observando as figuras 13 e 14. Pode constatar-se que o processo global de dia-ultrafiltração permitiu a remoção de cerca de 30% da lactose presente no concentrado inicial e 20% dos sais (como NaCl), contribuindo desta forma para a purificação da fração proteica. A concentração de proteína bruta é pouco afetada pelo processo de dia-ultrafiltração. No caso das membranas RC70PP a proteína é apenas um pouco concentrada no processo global, dado que a sua eficiência de remoção é ligeiramente negativa (1,05%), enquanto com as membranas ETNA01PP ocorre uma pequena remoção de cerca de 1,9%.



**Figura 13- Variação da eficiência de remoção de alguns componentes ao longo do processo de dia-ultrafiltração simples com as membranas RC70PP**



**Figura 14 - Variação da eficiência de remoção de alguns componentes ao longo do processo de dia-ultrafiltração simples com as membranas ETNA01PP**

### 3.4 Ensaios de diafiltração mistos em modo de ultrafiltração

Nesta seção são apresentados os resultados da diafiltração mista obtidos com as duas membranas em análise.

#### 3.4.1 Variação dos fluxos de permeado com o tempo ao longo das etapas de diafiltração mista

Nas figuras 15 e 16 observa-se um comportamento análogo ao verificado nos ensaios anteriores. nos quais se usou a dia-ultrafiltração simples, ou seja, durante o processo de dia-ultrafiltração mista, os fluxos de permeado permanecem constantes e próximos dos ensaios de concentração controlo, respetivos.

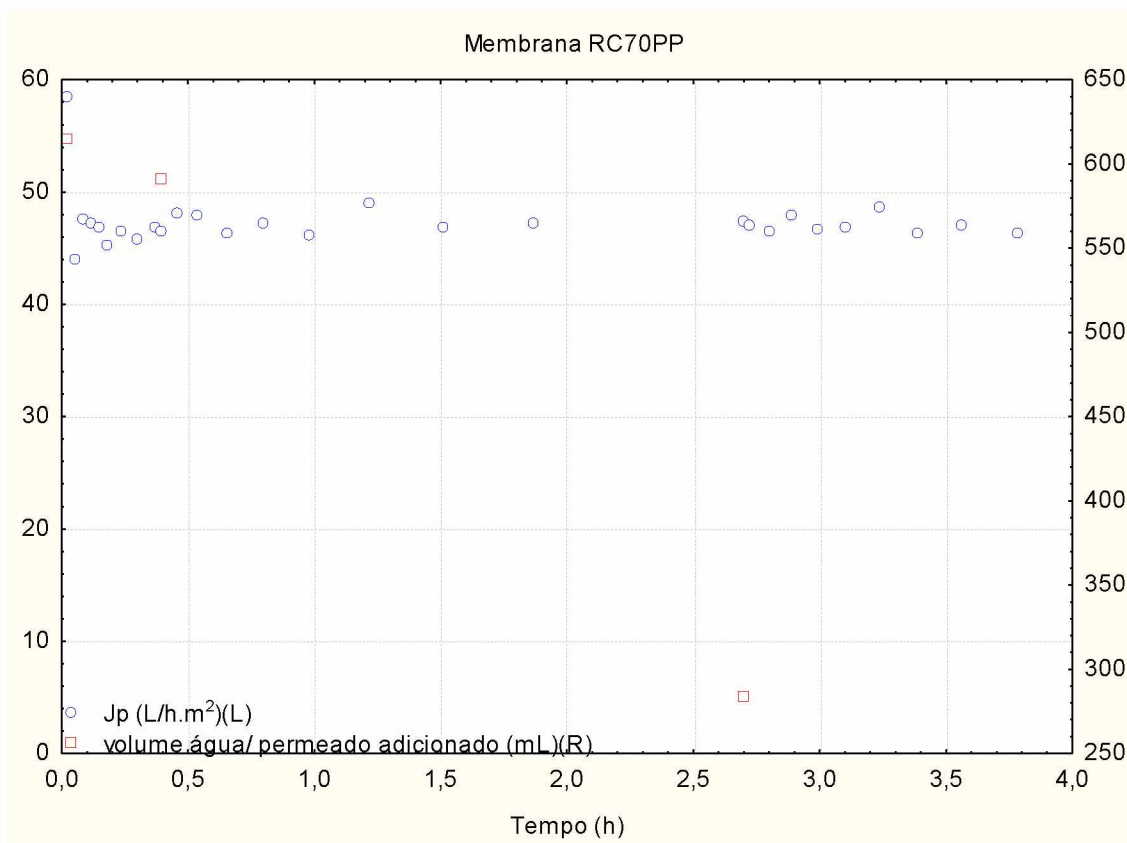
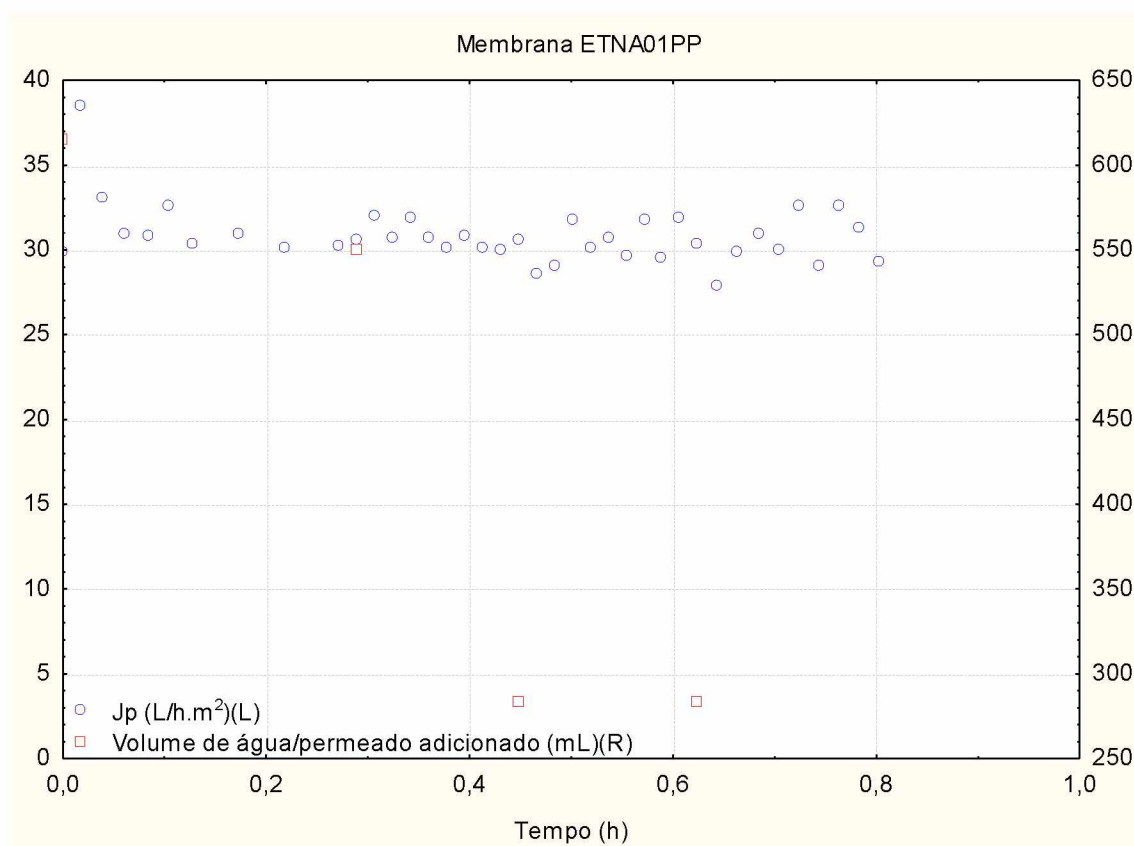


Figura 15- Variação dos fluxos de permeado ao longo do processo de diafiltração mista obtida com as membranas RC70PP





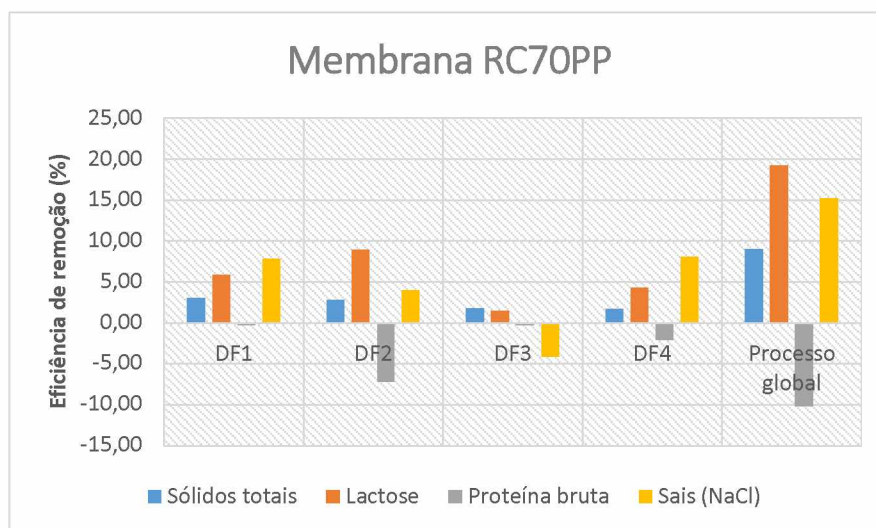
**Figura 16- Variação dos fluxos de permeado ao longo do processo de diafiltração mista obtida com as membranas ETNA01PP**

### 3.4.2 Avaliação das eficiências de remoção durante os ensaios de dia-ultrafiltração mistos

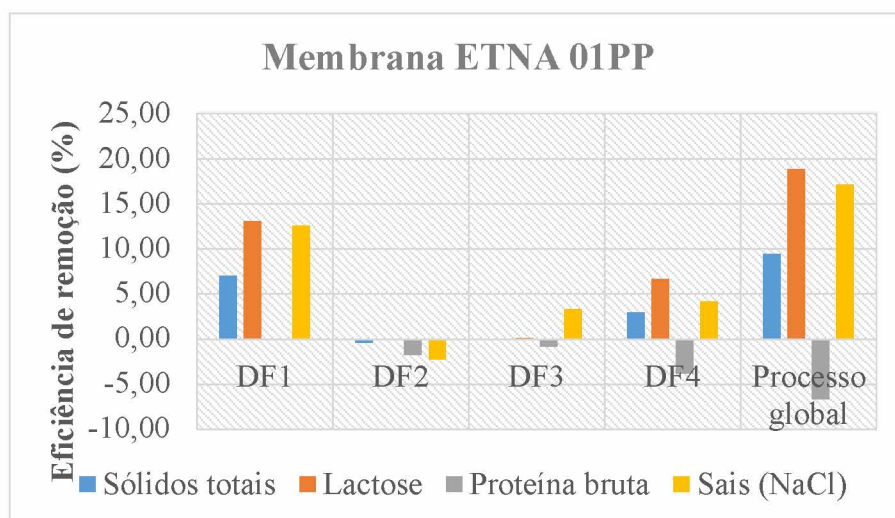
As figuras 17 e 18 apresentam a variação das eficiências de remoção ao longo dos processos de dia-ultrafiltração mistos, realizados com as membranas RC70PP e ETNA01PP. As quatro etapas realizadas são designadas por DF1, DF2, DF3 e DF4.

Comparando estes resultados com os obtidos no processo de diafiltração simples (realizado apenas com adição de água desionizada) verifica-se que as eficiências de remoção globais, quer da lactose ou dos sais são nitidamente menores, uma vez que a percentagem de lactose removida não atinge sequer os 20% e a remoção de sais é inferior a 20%, enquanto nas diafiltrações simples a remoção de lactose atinge os 30% e a remoção de sais é superior a 20%. Este comportamento é, provavelmente, devido ao facto das soluções usadas nas etapas 2 e 3 (DF2 e DF3) serem permeados das etapas anteriores, pelo que, quer a transferência de lactose, quer a transferência de sais para as correntes de

permeado nestas etapas, foi condicionada pela pequena diferença de concentrações destes componentes entre o concentrado inicial e as soluções de diafiltração. Por outro lado, não houve transferência de proteína bruta para o permeado, dado que as eficiências de remoção são sempre negativas ao longo de todo o processo.



**Figura 17 - Variação da eficiência de remoção de alguns componentes ao longo do processo de dia-ultrafiltração misto com as membranas RC70PP**

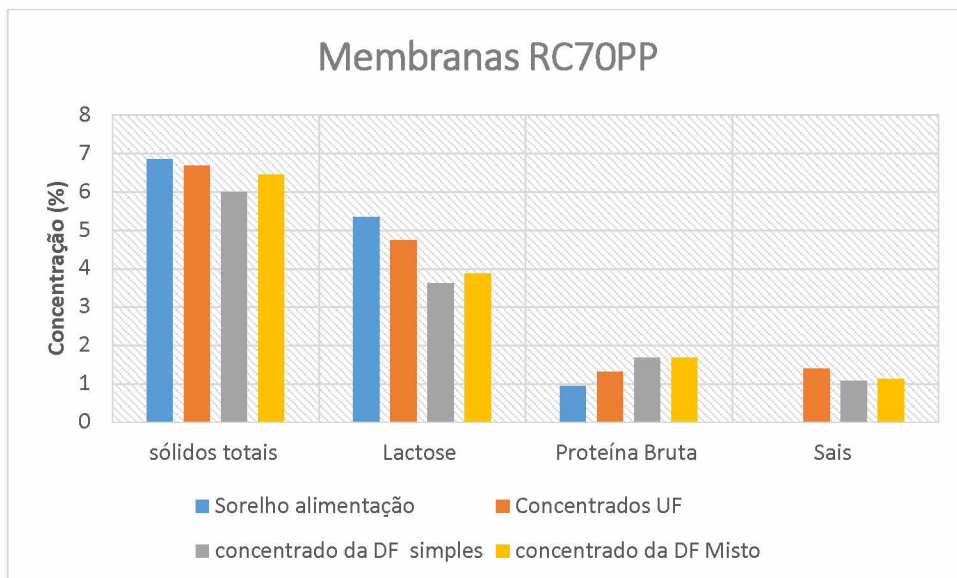


**Figura 18 - Variação da eficiência de remoção de alguns componentes ao longo do processo de dia-ultrafiltração misto com membranas ETNA01PP**

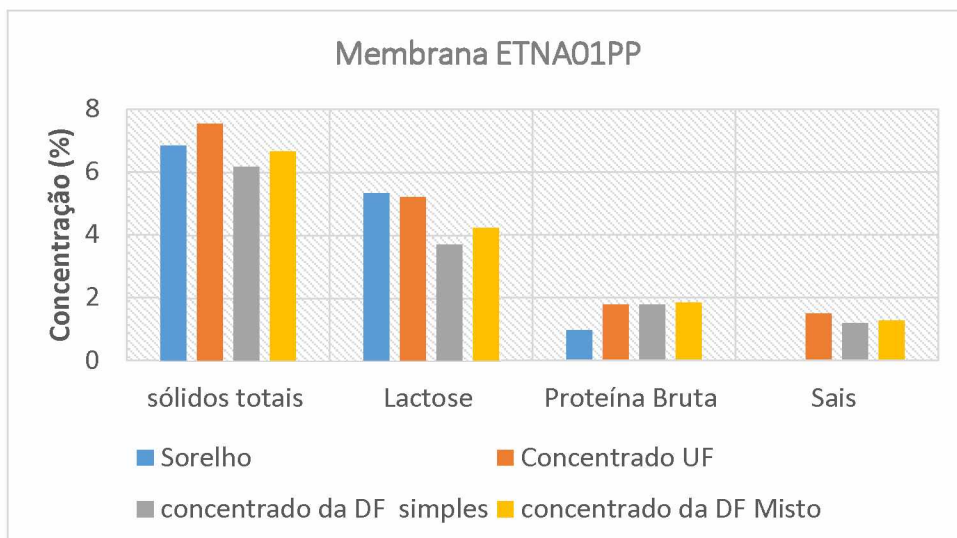
### 3.4.3 Comparação entre as composições dos concentrados finais

Uma comparação entre os resultados da composição média dos vários concentrados obtidos (ensaio de controlo, ensaios de diafiltração simples e ensaios de diafiltração mista) está apresentada nas figuras 19 e 20, para as membranas RC70PP e ETNA01PP. Verifica-se que a utilização do processo de dia-ultrafiltração permitiu reduzir o teor de lactose e sais, obtendo-se assim concentrados de proteína mais purificados. No entanto, no processo de diafiltração mista, apesar de se ter poupado água, porque nas duas etapas intermédias foram reutilizados permeados das etapas anteriores, a sua eficiência foi inferior ao da diafiltração simples.

Em relação ao soro inicial, observa-se que os processos de dia-ultrafiltração permitiram uma redução significativa da concentração de lactose e um aumento da concentração de proteína, o que poderá contribuir para a sua valorização.



**Figura 19 - Composição média do sorelho pré-tratado e dos concentrados obtidos a partir da sua ultrafiltração com membranas RC70PP**



**Figura 20 - Composição média do sorelho pré-tratado e dos concentrados obtidos a partir da sua ultrafiltração com membranas ETNA01PP**

## Capítulo 4 - Conclusão e perspectivas futuras

As membranas de ultrafiltração testadas para o fracionamento entre a proteína e a lactose do soro de ovelha revelaram ser pouco suscetíveis a problemas de colmatção, uma vez que após os primeiros minutos do início do processo, os fluxos de permeado mantiveram-se constantes até ao final dos ensaios. Contudo, uma vez que os ensaios de ultrafiltração foram realizados até um fator de concentração volúmico (FCV) relativamente baixo ( $FCV = 2,0$ ), será interessante analisar futuramente o seu comportamento até FCV's mais elevados, mais próximos de uma escala industrial.

As membranas RC70PP, de maior tamanho de poro, permitiram obter maiores fluxos de permeado (maior produtividade) com uma área de membrana que foi metade da usada com as membranas ETNA01PP, de menor tamanho de poro. No entanto, a sua seletividade para a separação entre as duas frações (proteína e lactose) foi inferior, o que poderá significar que alguma proteína e/ou outros compostos de azoto presentes de menor massa molar (fração proteose peptona, aminoácidos livres) tenham permeado através da membrana. Uma análise detalhada da fração azotada dos concentrados e permeados obtidos poderia elucidar este comportamento.

Desta forma, como geralmente acontece, a produtividade e a seletividade das membranas não estão diretamente relacionadas, pelo que a seleção da membrana mais adequada irá depender do produto final que se pretende obter. Tendo sido um dos objetivos deste trabalho otimizar a separação entre as duas frações referidas (proteína e lactose), a utilização das membranas ETNA01PP poderá ser mais promissora, já que permite uma maior recuperação da fração proteica, apesar da sua menor produtividade.

Relativamente aos processos de dia-ultrafiltração testados, verificou-se que a adição simples de água desionizada permitiu uma maior permeação dos solutos de menor massa molar para a corrente de permeado, conforme o pretendido. A fim de melhorar a eficiência desta operação deverão usar-se mais etapas, até conseguir uma remoção máxima, desde que a retenção da proteína (ou da fração azotada) não seja negativamente afetada. No processo designado por dia-ultrafiltração mista, nas etapas intermédias, onde foi utilizado permeado das etapas anteriores, foram pouco eficientes, pelo que deverão ser utilizadas outras estratégias futuramente, de forma a aumentar o seu rendimento e garantir um menor consumo de água.

## Bibliografia

- Alfa Laval*. (2017). Obtido em 7 de Fevereiro de 2017, de <http://www.alfalaval.com/products/separation/membranes/Flat-sheet-membranes/>
- Assenat, L. (1985). *Le lait de brebis: composition et propriétés in " Laites et Produits Laitiers, vache, brebis, chèvre*. Paris : Technique et Documentation Lavoisier.
- Baldasso, C. (2011). *Fracionamento dos componentes do soro de leite através da tecnologia de separação por membranas*. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Berger Yves, P. B.-G. (2004). Principles of Sheep dairyng In North of América. Wisconsin. Obtido em 14 de Dezembro de 2016, de <http://www.ansci.wisc.edu/Extension/Principles%20of%20Sheep%20Dairying%20in%20North%20America%20UWI%20156%20pages.pdf>
- Brito, M. A., González, F. D., Ribeiro, L. A., Campos, R., Lacerda, L., Barbosa, P. R., & Bergmann, G. (Maio-junho de 2006). Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: Variações na gestação e na lactação. 36, p. 3. Obtido de [https://www.researchgate.net/publication/26430359\\_Composicao\\_do\\_sangue\\_e\\_do\\_leite\\_em\\_ovinos\\_leiteiros\\_do\\_sul\\_do\\_Brasil\\_variacoes\\_na\\_gestacao\\_e\\_na\\_lactacao](https://www.researchgate.net/publication/26430359_Composicao_do_sangue_e_do_leite_em_ovinos_leiteiros_do_sul_do_Brasil_variacoes_na_gestacao_e_na_lactacao)
- Bylund, G. (1995). Tetra Pak Processing Systems. Em *Dairy Processing Handbook* (p. 427).
- Cayot, P., & Lorient, D. (1998). *Structures et technofonctions des protéines du lait*. Paris : Arilait Recherches. Technique & Documentation.
- Cheryan. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook* (2nd Edition ed.). United States of America: CRC Press.
- Daufin G., R. F. (1998). Les separations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire. (P. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Ed.) Paris.

- Fox, P., & McSweeney, P. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Thomson Science .
- H.S. Alkhatim, M. A. (1998). Treatment of whey effluents from dairy industries by nanofiltration membranes. *Desalination*. Valência, Espanha. Obtido de <file:///F:/Bibliografia%20Tese%20Mestrado%20Ultrafiltração%20e%20Diafiltração/Bibliografia%20Ultrafiltração/1-s2.0-S0011916498001428-main.pdf>
- Haraguchi, F. K., Abreu, W. C., & Paula, H. D. (Julho/Agosto de 2006). Proteínas do soro do leite: composição , propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. 4, pp. 479-488. Obtido em 16 de janeiro de 2017, de <http://www.scielo.br/pdf/rn/v19n4/a07v19n4>
- Harris, P. (1990). *Food gels: whey protein*. London and New York: Elsevier Applied Science.
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., & Gómez-Ruiz, J. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant*.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Amigo, L. (2008).  $\beta$ -lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, 35, 257-265.
- Horton. (1995). Commercial utilization of minor milk components in the health and food industries. *J. Dairy Sci*, 78(11), 2584-2589.
- INE. (2015). Estatísticas Agrícolas . Instituto Nacional de Estatística, I.P. Obtido de [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_publicacoes&PUBLICACOESpub\\_boui=271434407&PUBLICACOESmodo=2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=271434407&PUBLICACOESmodo=2)
- Kevin W.K. Yee, D. E. (2007). Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating conditions. *Journal of Membrane Science*, 290, 125-137. Obtido de [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
- Leidens, N. (2013). Concentração das proteínas do soro de leite de ovelha por ultrafiltração e determinação das propriedades funcionais dos concentrados proteicos. Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil. Obtido em 16 de Novembro de 2016, de [www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/96420/000913918.pdf?sequence=1](http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/96420/000913918.pdf?sequence=1)
- Lipnizki, F. (2010). Membrane Technology. *Membranes for food applications*.



- Loeb, S., & Sourirajan, S. (1962). Seawater demineralisation by means of an osmotic membrane. *Adv chem*, 38, 117-132.
- Macedo, A. (2013). *Manual de apoio para as aulas teóricas de Processos de separação*. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Beja, Beja.
- Macedo, A. D. (18 de Abril de 2011). The role of concentration polarization in ultrafiltration of ovine cheese whey. *Journal Science*, pp. 34-40.
- Macedo, A. D. (2015). Assesment of the performance of three ultrafiltration membranes for fractionation of ovine second cheese whey. *International Dairy Journal*, 48, 31-37.
- Macedo, A. M. (2005). *Aplicação de tecnologias de membranas na valorização de subprodutos resultantes do fabrico do Queijo Serpa. Relatório de Progresso Final do Projecto Agro nº 327. Escola Superior Agrária. Beja, Portugal*.
- Macedo, A. T. (2010). Fraccionamento de Lactossoro de Ovelha por Tecnologias de Membranas e Estudo das Possíveis Utilizações dos Concentrados Obtidos. Lisboa.
- Mangino, M. E. (1992). *Properties of whey protein concentrates*. In *Whey and Lactose Processing*. (J. G. ed, Ed.) Elsevier Science Publishers.
- Marshall, A., & Daufin, G. (1995). *Physico-Chemical aspects of membrane fouling by dairy liquids*. Berlgium: Dairy Federation.
- Maubois, J. L. (1997). *Extraction of milk proteins*. In *"Food proteins and their applications*. New York: Damadoran S., Paraf A. eds, Marcel Dekker.
- Miller, G., McBean, L., & Jarvis, J. (2000). HandBook of Dairy Foods and Nutrition.
- Mizubuti, I. Y. (Março de 1994). Soro de leite; composição, Processamento e Utilização na Alimentação. 15, pp. 80-94. Obtido em 20-12-2016 de Dezembro de 2016, de [https://www.researchgate.net/publication/277159402\\_Soro\\_de\\_leite\\_composicao\\_o\\_processamento\\_e\\_utilizacao\\_na\\_alimentacao](https://www.researchgate.net/publication/277159402_Soro_de_leite_composicao_o_processamento_e_utilizacao_na_alimentacao)
- Morr, C. (1989). *Developments in Dairy Chemistry* (Vol. 4). Elsevier Applied Science.
- Muller, M. (1996). *Basic principles of Membrane Technology* (2 ed.). (K. Academic, Ed.) Netherlands.



- Park, Y., Juarez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. (2007). Small Ruminant Research . *Physico-Chemical Characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant*, 68, pp. 88-113.
- Pawlowsky, J. G. (Setembro/Outubro de 2001). o soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. 10. Obtido em 20 de Dezembro de 2016, de <http://www.signuseditora.com.br/ba/pdf/10/10%20-%20Laticinios.pdf>
- Pereira, C. D. (2002). Valorization of by products from ovine cheese manufacture: clarification by thermocalcic precipitation/ microfiltration before ultrafiltration. *International Dairy Jornal*, 12, 773-783.
- Rohenkohl, J. E., Corrêa, G. F., Azambuja, D. F., & Ferreira, F. R. (2011). O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. 39, 97-114. Obtido de <http://apecco.com.br/wp2013/wp-content/uploads/2014/11/OAgroneg%C3%B3cioDeLeiteDeOvinosECaprilinos.pdf>
- Rosa, M. M. (1994). Separation of organic solutes by membrane pressure-driven processes. *Journal of Membrane Science*, 89, 235-243.
- Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18, 458-465.
- Sgarbieri, V. (2004). *Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite*. São Paulo.
- Shahidi, F. &. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 914-931.
- Skoet, Stefano Gerosa and Jakob. (12 de Fevereiro de 2012). Milk availability: trends in production and demand and mediumterm. 2-40. Obtido de <http://www.fao.org/docrep/015/an450e/an450e00.pdf>
- Van Loon, L. J. (2000). *Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate* (Vol. 72 (1)). Am. J. Clin. Nutr.
- Walstra, P. G., & A.Noomen, A. M. (2001). *Ciência de la leche e tecnología de los produtos lácteos*. Zaragoza, España: Acribia;S.A.

- Yee K. W. K., W. D., & J. B. (2007). *Whey Protein Concentrate Production By Continuous Ultrafiltration: Operability Under Constant Operating Conditions* (Vol. 290). Journal of Membrane Science.
- Zydney. (1998). Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. *International Dairy Journal*, 8, 243-250.

## Anexo

### Reta de calibração do cloreto de sódio

Concentração dos padrões, $C_{\text{NaCl}}$ (g L <sup>-1</sup> )	Condutividade elétrica, K (mS cm <sup>-1</sup> )
0 (água desionizada)	0,0037
0,50	1,20
0,75	1,61
1,00	2,09
1,50	3,10
1,75	3,59
2,00	4,10
Reta de calibração	
$K = 2,01 C_{\text{NaCl}} + 0,086 \quad r = 0,999$	